



**Universidade de
Aveiro
2008**

Departamento de Biologia

**Amélia Gonçalves Almendra
Rodrigues**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE DNA EM AMOSTRAS
DEGRADADAS**



**Universidade de
Aveiro
2008**

Departamento de Biologia

**Amélia Gonçalves Almendra
Rodrigues**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE DNA EM AMOSTRAS
DEGRADADAS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Luís Souto Miranda, Assessor do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho a todos aqueles que o tornaram possível com esforço, dedicação e empenho.

Agradeço ao Professor Doutor Luís Souto Miranda, meu orientador, pelo acompanhamento e orientação prestados, mas principalmente pela paciência e compreensão que sempre demonstrou.

Agradeço também às minhas colegas de mestrado, a Josiana e as Marias João, que sempre me acompanharam, ajudaram e se mostraram disponíveis para os maiores sacrifícios.

Agradeço ainda à minha família, a minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão, que me apoiaram sempre nos momentos mais complicados (que foram muitos).

Deixo também um sincero agradecimento a todos os meus colegas de trabalho, que sempre perceberam as minhas dificuldades e se disponibilizaram a enfrentá-las comigo.

Não posso deixar de agradecer de forma muito sincera a uma amiga muito especial, a Cristiana, que sentiu as minhas dificuldades, que me ajudou a ultrapassá-las e que esteve sempre pronta a resolvê-las comigo.

O último agradecimento, mas não menos importante, vai para a pessoa que está sempre do meu lado, mesmo longe, mas que me ajudou sempre a ultrapassar os bons e maus momentos, o Leal.

O júri

Presidente

Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora Associada com Agregação, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro.

Vogais

Doutor Luís Manuel Souto de Miranda, Assessor (orientador), Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro.

Doutor António Carlos Matias Correia (co-orientador), Professor Associado com Agregação, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Doutora Anabela de Oliveira Pereira (arguente principal), Investigadora Pós-Doc, CESAM - Centro de Estudos do Ambiente e do Mar.

Palavras-chave

DNA, Genoma Humano, LCN, Polimorfismos, STR, SNP, miniSTR, PCR.

Resumo

O presente trabalho tem com principal objectivo a divulgação das metodologias actualmente empregues na análise forense de amostras degradadas. A revisão bibliográfica exposta representa todo o processo que envolve a análise de uma amostra forense, particularmente de uma amostra *Low Copy Number*. Este trabalho faz uma apresentação da evolução histórica da ciência forense seguida de uma abordagem geral de conceitos base necessários à compreensão do mesmo. Numa segunda fase, é analisado todo o percurso laboratorial de uma amostra forense. Neste contexto são abordados os métodos de colheita, extracção, quantificação e amplificação do DNA, nomeadamente os métodos que se aplicam à análise de amostras LCN.

Este trabalho pretende fazer a divulgação de uma área de amplo e emergente interesse, não meramente científico mas também cultural.

Keywords

DNA, Human Genome, LCN, Polymorfisms, STR, SNP, miniSTR, PCR.

Abstract

The main objective of the present work is to divulge the current methodologies used for degraded forensic samples analyze. The bibliographic review shown here represents all the processes which involve the forensic samples analysis, particularly the Low Copy Number samples.

This work presents the historical development of forensic science followed by a general approach of the basic concepts in order to contextualize it.

Furthermore, all the steps to characterize a forensic sample are analyzed, and in this context, collection, extraction, quantification and DNA amplification methods are addressed, including the applied methods to LCN samples analyses.

This work aims to reveal an area with a wide and emerging importance of not only scientific interest but also cultural.

Índice

Capítulo 1	7
Evolução histórica na genética forense	8
 Capítulo 2	 10
Genética Forense – Conceitos básicos.....	11
2.1. Ácido Desoxirribonucleico.....	11
2.1.1. Constituição do DNA.....	12
2.1.2. Vantagens da análise do DNA.....	14
2.2. O genoma humano.....	15
2.2.1. Genoma Nuclear.....	17
2.2.2. Genoma Mitocondrial.....	19
2.3. Investigação forense	21
 Capítulo 3	 22
Amostras degradadas	23
3.1. Causas de degradação do DNA	23
3.2. Possíveis danos na estrutura do DNA.....	24
3.3. Amostras LCN.....	25
 Capítulo 4	 27
Análise de amostras forenses.....	28
4.1. Colheita de amostras forenses	28
4.1.1. Colheita de amostras LCN	29
4.2. Extracção de DNA.....	30
4.2.1. Precauções num laboratório de análise forense	31
4.2.2. Métodos de extracção de DNA	33
4.2.2.1. Extracção de amostras LCN.....	34
4.3. Quantificação do DNA extraído	37
4.3.1. Polimerase Chain Reaction	37
4.3.1.1. Inibidores da PCR	45
4.3.2. Outras metodologias	48
4.5. Amplificação e análise do DNA extraído.....	52
4.5.1. Artefactos na análise de DNA	53
 Capítulo 5	 56
Polimorfismos do DNA.....	57
5.1. STR.....	57
5.1.1. STRs autossómicos	60
5.1.2. STRs do cromossoma Y	63

5.1.3. <i>STR do cromossoma X</i>	65
5.1.4. <i>MiniSTRs</i>	66
5.2. DNA Mitocondrial.....	80
5.3. SNP.....	82
Capítulo 6	93
Considerações finais	94
Capítulo 7	97
Bibliografia.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do Ácido Desoxirribonucleico	11
Figura 2 -Estrutura química das bases azotadas do DNA (Adenina, Citosina, Guanina e Timina).	13
Figura 3 – Ligações químicas do DNA	14
Figura 4 - Constituição do Genoma Humano	17
Figura 5 - Organização do Genoma Nuclear.	18
Figura 6 – Genoma Nuclear Humano.....	19
Figura 7 - Genoma mitocondrial Humano.....	20
Figura 8 - Dano hidrolítico na molécula de DNA.	24
Figura 9 - Dano oxidativo numa das base azotada (Guanina) do DNA	25
Figura 10 - Colheita de amostras com uma zaragatoa.....	30
Figura 11 - Câmara de fluxo laminar.....	32
Figura 12 - Desinfectante MicroSol 3'.....	33
Figura 13 - Filtro <i>Microcon</i>	35
Figura 14 -Extensão dos <i>primers</i>	39
Figura 15 - <i>Nested</i> PCR.	42
Figura 16 - Evolução da PCR em Tempo Real.	44
Figura 17 - Molécula de Hemoglobina.....	47
Figura 18 - Estrutura química da porfirina	47
Figura 19 – Procedimento geral de uma electroforese: (A) colocação da agarose na câmara; (B) Pipetagem da solução corante de alta densidade; (C) Início da electroforese por aplicação do campo magnético; (D) Visualização do gel através de raios UV	50
Figura 20 - Sistema <i>Slot Blot</i>	51
Figura 21 – <i>NanoDrop</i>	51
Figura 22 -Dois alelos pequenos (a) e (b), com dois alelos grandes (c) e (d), onde o alelo (b) representa um produto <i>stutter</i>	53
Figura 23 - <i>Short Tandem Repeat</i> tetramérico.....	57
Figura 24 – 13 <i>Loci</i> STR do programa CODIS e sua posição cromossomal	59
Figura 25 - Cromossoma Y.	63
Figura 26 - Cromossoma X.	65
Figura 27 - Electroferograma do perfil feminino para o <i>Decaplex X-STR</i>	66

Figura 28 - Representação esquemática de <i>primers</i> miniSTR.	67
Figura 29 - Comparação das alturas dos alelos STR obtidas a partir do <i>kit</i> comercial <i>PowerPlex</i> [®] 16 (A) e do <i>miniplex</i> 1 (B) com quantidades equivalentes da mesma amostra de manchas de sangue envelhecido.....	69
Figura 30 – Comparação do tamanho dos alelos STR obtidos a partir do <i>Kit PowerPlex</i> [®] 16 (A) e dos <i>loci miniplex01</i> (B) e <i>miniplex02</i> (C) com montantes equivalentes da mesma amostra de osso degradado. As alturas estão em unidades de fluorescência relativa (RFUs - <i>Relative Fluorescence Units</i>)	72
Figura 31 – DNA mitocondrial – Região D - loop.	81
Figura 32 - Região do mtDNA de interesse forense.....	82
Figura 33 – Hibridização com oligonucleótidos alelo específicos.	85
Figura 34 – Reacções que envolvem a Extensão de <i>primers</i> : Minisequenciação (A) e Extensão alelo específicos (B)	
Figura 35 - Ensaio de ligação de oligonucleótidos (OLA): dois ensaios alelo específicos e uma sonda de ligação comum necessários à ligação ao SNP	87
Figura 36 – Clivagem Invasiva clivagem: oligonucleótidos que exigem sondas <i>Invader</i> e alelo que se ligam ao DNA alvo com sobreposição de um nucleótido	88
Figura 37 - Princípio da técnica <i>Snapshot</i>	89
Figura 38 - Visualização dos resultados obtidos com a marcação com os diferentes ddNTPs.	90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems)</i>	52
Tabela 2- <i>Kits</i> comerciais de amplificação de STRs autossômicos da <i>Applied Biosystems</i> 61	
Tabela 3 - <i>Kits</i> comerciais de amplificação de STR da <i>Promega</i>	62
Tabela 4 – <i>Kits</i> comerciais utilizados na amplificação de STRs do cromossoma Y (<i>AmpFlSTR® Yfiler™</i> – <i>Applied Biosystems</i> e <i>PowerPlex® Y System</i> - <i>Promega</i>)....	64
Tabela 5 - <i>Miniplex</i> desenvolvidos por Butler <i>et al.</i> (2003). O " <i>Big Mini</i> " é uma combinação dos <i>miniplexes</i> 1 e 3 e permite a análise de 6 STRs que não se sobrepõem em termos de tamanho	68
Tabela 6 - Sequência de <i>primers</i> miniSTRs presentes neste estudo. O NED, FAM E VIC (<i>Applied Biosystems</i>) referem-se marcadores fluorescentes utilizados.	70
Tabela 7 – Conjunto de <i>loci</i> dos <i>miniplex01</i> e <i>miniplex02</i>	71
Tabela 8 - Locus, sequência de primers e dye colors para este ensaio miniSTR multiplex	74
Tabela 9 – Kit de amplificação <i>Mentype® Nonaplex^{QS}</i> da <i>BioType AG</i>	75
Tabela 10 – Condições de amplificação do Kit comercial <i>Mentype® Nonaplex^{QS}</i>	76
Tabela 11 – <i>Loci</i> e concentrações de <i>primers</i> utilizados	77
Tabela 12 - <i>Kits</i> comerciais de amplificação de STR da <i>Applied Biosystems</i>	78
Tabela 13 - Resultados obtidos com amostras analisadas utilizando o <i>Identifiler™</i> e <i>MiniFiler™</i>	79
Tabela 14 – Características gerais e aplicações do <i>SNaPshot® Multiplex System</i>	91

Siglas

A - Adenina

ASO – Allelo específico oligonucleotid

C - Citosina

BSA - Bovine Serum Albumin

D-loop - Displacement loop

DNA - Desoxirribonucleic Acid

DTT – Dithiothreitol

EDNAP - European DNA Profiling
Group

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

ENFSI - European Network of Forensic
Science Institutes

G – Guanina

GEP-ISFG- Grupo Espanhol e Português
da Sociedade Internacional de Genética
Forense

HLA - Histocompatibility Leucocyte
Antigen

Kb - Kilobases

LCN - Low Copy Number

LMD – laser microdissection

LR - likelihood ratio

miniSTR - mini Short Tandem Repeats

mtDNA - mitochondrial
deoxyribonucleic acid

MSP - Maximum-Scoring Segment Pair

ng - nanogramas

OLA – Oligonucleotid ligand assay

PCR – Polymerase Chain Reaction

pM - probabilidade de matching

RFLP - Restriction Fragment Length
Polymorphism

RNA - Ribonucleic Acid

RFU - Relative Fluorescence Units

SDS - Sodium Dodecyl Sulphate

SGM - Second-generation systems
multiplex

SNP - Simple Nucleotide Polymorfisms

STR - Short Tandem Repeats

T - Timina

VNTR - Variable Number of Tandem
Repeats

WGA - Whole Genome Amplification

Capítulo 1

Evolução histórica na genética forense

Evolução histórica na genética forense

A ciência forense abrange diferentes áreas do conhecimento desde a biologia à química, passando pela física ou pela matemática. Uma das áreas amplamente utilizada é biologia forense, principalmente no que respeita à análise do DNA (*Deoxyribonucleic Acid*). A análise forense tem como principal objectivo a investigação do material biológico como principal forma de limitar ou reduzir o número de indivíduos que podem ser a fonte desse material (Jobling e Gill, 2004).

No início do século XX, Landsteiner descobriu os primeiros polimorfismos genéticos, os grupos sanguíneos ABO. Em 1915 Latters testou o primeiro anticorpo dos grupos eritrocitários (ABO, *Rhesus*, *CcDEe*, MNSs, *Lewis*, *Kell* e haplogrupos). Só na década de 20 foi estabelecida a Lei de *Locard* cujo princípio referia que "todo o contacto deixa um rastro", sendo a partir deste momento essencial a averiguação de todas as provas no local do crime, mesmo que, aparentemente, insignificantes. Até à década de 50, o exame forense de amostras biológicas, como forma de identificação pessoal, passou a ser consensual e baseava-se essencialmente na determinação dos grupos sanguíneos (Jobling e Gill, 2004).

Marcando uma segunda fase na evolução da ciência forense, em 1954, foi demonstrada a ocorrência de um sistema de histocompatibilidade mediado pelo antigénio na superfície dos leucócitos, conhecido por complexo HLA (*Histocompatibility Leucocyte Antigen*), determinado por genes alélicos muito próximos localizados no braço curto do cromossoma 6, com grande poder de discriminação individual ou de determinação da individualidade genética (Calabrez, 1999).

A terceira fase do desenvolvimento das ciências forenses voltadas para a identificação humana, surgiu na década de 80 com a aplicação da técnica de *fingerprinting* de *multilocus* do DNA, aplicada por Jeffreys. Esta técnica surgiu com a publicação de um artigo na revista *Nature* (1985) onde se determinavam as regiões de minissatélites no gene da mioglobina humana, aplicado à resolução de um problema de emigração, cujos resultados constituíam um conjunto de bandas, conhecido por impressão digital genética (DNA *fingerprint*). Em 1986, o mesmo autor aplicou esta técnica na identificação do verdadeiro esturpador e assassino de duas vítimas. A partir deste caso, a Criminalística e a

Medicina Legal passaram a ser empregues na tipagem molecular de DNA como principal determinante no esclarecimento de diversos delitos e na identificação humana (Moura-Neto, 1998). Ainda em 1986, Jeffreys utilizou os VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), analisados através da técnica designada por RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), como método genético de identificação e, com estes marcadores, resolveu o famoso caso de homicídio perpetrado por Colin Pitchfork (Moura-Neto, 1998).

A técnica de VNTR constituiu uma grande vantagem em relação às tradicionais técnicas serológicas, no entanto, esta técnica apresentava ainda algumas desvantagens, nomeadamente o facto de necessitar de DNA de alto peso molecular, não degradado e em grandes quantidades (idealmente acima dos 250 ng) que não é vulgarmente encontrado em casos forenses (Gill, 2001).

O primeiro kit comercial de análise forense por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) surgiu em 1988 e detectava **SNPs** (*Simple Nucleotide Polymorphisms*) de polimorfismos do *locus* HLA-DQA1 utilizando a técnica *dot blot* e a hibridação dos oligonucleótidos. Só em 1991 surgiu a aplicação dos polimorfismos **STRs** (*Short Tandem Repeats*) (Jobling e Gill, 2004). Os VNTRs deram, assim, lugar aos STRs passando a ser os marcadores genéticos de eleição (Butler, 2005).

Os STR têm um maior poder de discriminação analisando fragmentos de DNA de menor tamanho, possibilitando a obtenção de resultados a partir de DNA de baixo peso molecular ou degradado. Além disso, podem ser analisados através da **PCR**, o que possibilita a obtenção de inúmeras cópias dessa molécula a partir de quantidades muito baixas de material genético (Butler, 2005). Assim, conseguem-se analisar *loci* STR dispondo de pequenas quantidades de DNA, tendo geralmente, como limite de detecção 250 pg, sendo a quantidade ideal de 1 ng e usando 28 a 30 ciclos de amplificação para PCR (Gill, 2001).

Para além dos STR são actualmente utilizados outros marcadores genéticos como os SNP, os miniSTR (*mini Short Tandem Repeats*) e o mtDNA (*mitochondrial deoxyribonucleic acid*).

Capítulo 2

Genética Forense – Conceitos básicos

Genética Forense – Conceitos básicos

2.1. Ácido Desoxirribonucleico

Todos os organismos são constituídos por células, a unidade básica da vida. Em média, um ser humano adulto é composto por 100 bilhões de células, todas elas provenientes de uma única, o óvulo fecundado, desta forma todas as células do organismo humano contêm a mesma informação genética.

O **DNA** (Figura 1) é uma substância química que contém a informação necessária à replicação da célula. À molécula presente no núcleo, dá-se o nome de **DNA nuclear**, precisamente devido à sua localização (Videira, 2001). Além do DNA nuclear existe, ainda, o DNA mitocondrial (mtDNA) característico por ser um DNA extra-nuclear que se encontra nas mitocôndrias, herdado, exclusivamente, pela linhagem materna. Apesar destes dois tipos de DNA se diferenciarem pela sua origem e função, estruturalmente são similares (Turrina *et al.*, 2008).

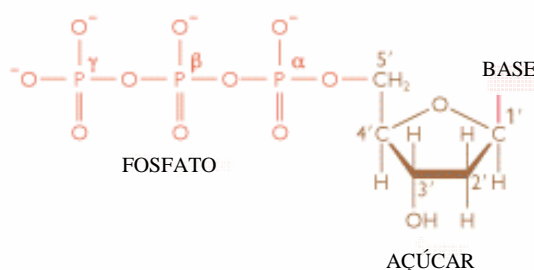


Figura 1 - Estrutura química do Ácido Desoxirribonucleico (Adaptado de www.medicina.med.up.pt, 2008-11-07).

Todo o conjunto de instruções para a formação de um organismo, isto é, todo o DNA existente numa célula, é vulgarmente conhecido como **genoma**. A informação proveniente do DNA nuclear é transmitida de geração em geração, sendo que cada indivíduo herda metade da informação genética da mãe e a outra metade do pai, com exceção do DNA presente no cromossoma Y, que só pode ser gerado pela linha paterna (Turrina *et al.*, 2008).

Como material hereditário, o DNA apresenta três requisitos fundamentais (Grilo, 2001):

- i) ser reproduzido com alta precisão (replicação) permitindo a conservação das espécies;
- ii) ser susceptível de sofrer alterações (recombinação e mutação), permitindo a evolução das espécies;
- iii) conter informação para a formação de proteínas, suporte estrutural e funcional de uma célula.

2.1.1. Constituição do DNA

Os ácidos nucleicos foram descobertos, em 1869, por Friedrich Miescher, um médico suíço de 22 anos de idade. Através de técnicas, notavelmente avançadas para a época, Miescher isolou dos núcleos de células de pús e de espermatozoides de salmão uma macromolécula nunca antes identificada, à qual deu o nome de nucleína. Foi Richard Altmann que, em 1889, atribuiu a esta substância a designação de **ácido nucleico**, por ter sido identificado no núcleo e por manifestar propriedades ácidas (Griffiths, 2000).

No início do século XX, o bioquímico Kossel evidenciou a existência de dois tipos de ácidos nucleicos: o DNA e o RNA (*Ribonucleic Acid*) (Griffiths, 2000).

Os ácidos nucleicos são moléculas de maior importância para os seres vivos, dado que controlam os processos vitais de todos os organismos. O **DNA** é constituído por subunidades repetitivas, sendo que cada nucleótido é constituído por três subunidades fundamentais, um açúcar (desoxirribose), um grupo fosfato e uma base azotada. Ao nucleótido do DNA dá-se o nome de desoxirribonucleótido. A nucleobase é responsável pela variação entre nucleótidos, enquanto que o grupo fosfato e o açúcar formam o “esqueleto”, sendo responsáveis pela estrutura base da molécula. As bases azotadas presentes numa molécula de DNA são a **Adenina** (A), **Citosina** (C), **Guanina** (G), **Timina** (T). Estas bases dividem-se em dois grupos, as purinas (Adenina e Guanina) que possuem uma estrutura de dois anéis e as pirimidinas (Timina e Citosina) que possuem apenas um anel (Grilo, 2001) (Figura 2).

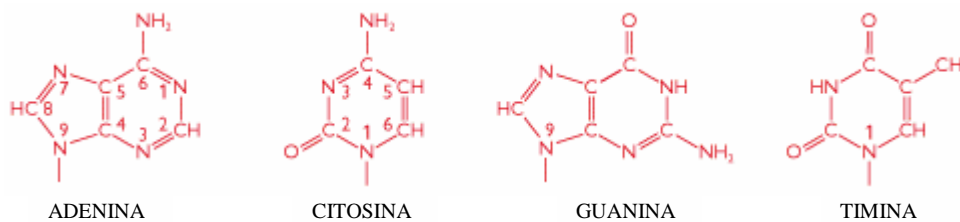


Figura 2 -Estrutura química das bases azotadas do DNA (Adenina, Citosina, Guanina e Timina)
(Adaptado de www.medicina.med.up.pt, 2008-11-07).

Toda a diversidade biológica entre espécies, bem como, entre indivíduos da mesma espécie, resulta das diferentes combinações possíveis entre as bases azotadas. Pode concluir-se, desta forma, que o conteúdo informativo do DNA é determinado pela sequência das suas bases (Videira, 2008).

A desoxirribose liga-se pelo carbono 5' ao grupo fosfato e pelo carbono 1' à base azotada. Os mononucleótidos são unidos por ligações covalentes (ligações fosfodiéster) entre o grupo fosfato de um nucleótido e o grupo OH-3' do açúcar do nucleótido seguinte. A cadeia polinucleotídica é uma molécula polar, uma vez que apresenta uma extremidade com um carbono 5' (livre) ligado a um grupo fosfato e a outra extremidade com um carbono 3' (livre) ligado a um grupo hidroxilo. Por sua vez, o nucleótido da extremidade 5' de uma cadeia emparelha com o nucleótido da extremidade 3' da outra, e vice-versa. Por este motivo, diz-se que a molécula de DNA é constituída por duas cadeias antiparalelas. Esta molécula, devido aos seus fenómenos de emparelhamento, permite que as suas cadeias enrolem uma sobre a outra, dando origem a uma dupla hélice de diâmetro constante (Figura 3) (Videira, 2008 e Grilo, 2001).

A estrutura tridimensional do DNA, deduzida em 1953 por James Watson e Francis Crick, é composta por duas cadeias polinucleotídicas que se ligam, na sua forma natural, uma à outra através de pontes de hidrogénio formadas entre as bases azotadas, processo denominado de hibridação. Todavia, estas ligações não ocorrem ao acaso, uma vez que os nucleótidos apenas emparelham com o seu nucleótido complementar. Entre as bases Adenina e Timina formam-se duas pontes de hidrogénio, enquanto que entre as bases Citosina e Guanina se formam três pontes. A cada conjunto de duas bases azotadas unidas por pontes de hidrogénio dá-se o nome de **pares de bases** (pb) (Cooper, 2001).

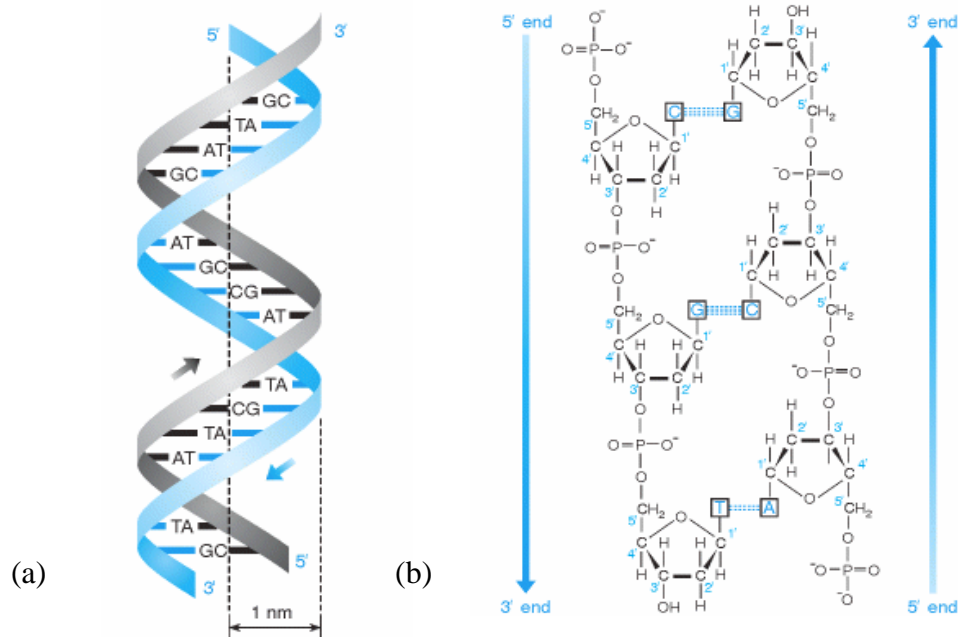


Figura 3 – Ligações químicas do DNA (Adaptado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites>, 2008-11-05).

2.1.2. Vantagens da análise do DNA

Weedn e Swarnen (1998) enumera uma série de vantagens da utilização da análise de DNA face à serologia tradicional. A principal vantagem da análise de DNA reside, segundo estes autores, na possibilidade da sua aplicação sobre toda e qualquer fonte de material biológico (sangue, cabelos, saliva, sêmen, tecidos, urina ou fezes), em oposição a um exame serológico completo, que apenas pode ser realizado no sangue. Outro factor, talvez o mais amplamente propalado, que legitima a utilização do exame de DNA é o seu potencial discriminatório de um em biliões, o que contrasta com o exame do grupo sanguíneo ABO, que apenas tem a capacidade de discriminar um em três indivíduos na população geral, e com os marcadores serológicos adicionais, cujos valores típicos discriminatórios são de um em alguns milhares. A sensibilidade do exame de DNA constitui outra grande vantagem deste método, sendo que a tipagem dos polimorfismos do DNA através da PCR pode ser efectuada com o DNA de poucas células, transpondo a sensibilidade dos exames tradicionais. Também a resistência do DNA aos factores

ambientais é referida por estes autores como sendo uma vantagem muito importante em relação à serologia tradicional. O DNA é uma molécula robusta, relativamente resistente aos ácidos e detergentes, diferentemente dos determinantes proteicos, lipídicos e carboidratos. Consequentemente, os exames com DNA, ao contrário dos marcadores serológicos tradicionais, podem ser realizados com maior segurança em amostras muito antigas e expostas a maiores agressões ambientais. Finalmente, a possibilidade de se separar o DNA nuclear de todo o outro material celular, o que permite uma informação individual mais específica, é também um elemento diferenciador deste método relativamente aos outros existentes o que lhe concede vantagens em termos fiabilidade de resultados.

2.2. O genoma humano

O perfil genético de um indivíduo é determinado por um conjunto de características genéticas a partir do qual uma amostra biológica pode ser atribuída a um determinado indivíduo de forma inequívoca. Estas conclusões são possíveis devido às características únicas do DNA: é individualizante, perene, não se alterando com a idade e todas as células do indivíduo contêm a mesma informação genética. A característica fundamental de uma molécula DNA é a sua sequência nucleotídica, assim sendo, se a sequência da molécula de DNA for conhecida, então os genes que ela contém podem ser identificados e as actividades desses genes podem ser estudados ao pormenor (Videira, 2001).

Desde meados da década de 70 que biólogos moleculares foram capazes de obter as sequências mais longas e com mais fragmentos de DNA, culminando na década de 90 com a conclusão da primeira sequência completa do genoma humano (Videira, 2001).

O *Projecto do Genoma Humano* foi concebido em 1984, no entanto, apenas se começou a desenvolver em 1990 com o objectivo de determinar a sequência de nucleótidos de todo o genoma nuclear humano. O genoma mitocondrial (muito menor) foi sequenciado no início de 1980 (Videira, 2001). Um segundo projecto do genoma humano foi criado por uma empresa privada, a *Celera Genomics* de Maryland, nos Estados Unidos da América, em 1998. Os dois projectos foram concluídos em 2001 e os resultados foram publicados em Fevereiro do mesmo ano. Estes projectos não sequenciaram o genoma no seu todo, apenas 83 – 84 %, uma vez que os restantes 16 – 17 % correspondem aos telómeros

(extremidades dos cromossomas) e às zonas circundantes aos centrómeros, onde poucos genes, se houver, estão localizados (Viseira, 2001 e Brown, 2002).

Na realidade, existem dois genomas, um **genoma nuclear**, complexo, que representa 99,9995 % do total da informação genética, e um **genoma mitocondrial**, simples, que representa os restantes 0,0005 % (Figura 4) (Andrew, 1999).

Embora seja prática corrente referir-se à sequência do genoma humano, como forma única, deve ter-se em consideração que existem de facto muitas sequências do genoma, já que cada indivíduo, com excepção dos gémeos idênticos, tem a sua própria versão. As diferenças entre os genomas individuais são, em grande parte, devido a polimorfismos de nucleotídeo único, posições no genoma em que algumas pessoas têm um nucleótido e outros têm um outro diferente. Mais de 1,4 milhões de SNP foram identificados, em média, de um para cada 2 kb da sequência. Em média, também, a cada 2 kb existe um microssatélite, que não é mais que uma série de nucleótidos repetidos, em que o número de repetições é variável de indivíduo para indivíduo. Muitos destes SNPs e STRs não têm efeito sobre a função do genoma, ao contrário de muitos outros. Por exemplo, 60.000 SNPs cabem dentro dos genes e, pelo menos, alguns têm um impacto sobre a actividade desses genes, levando a variações das características biológicas de cada indivíduo em particular (Brown, 2002).

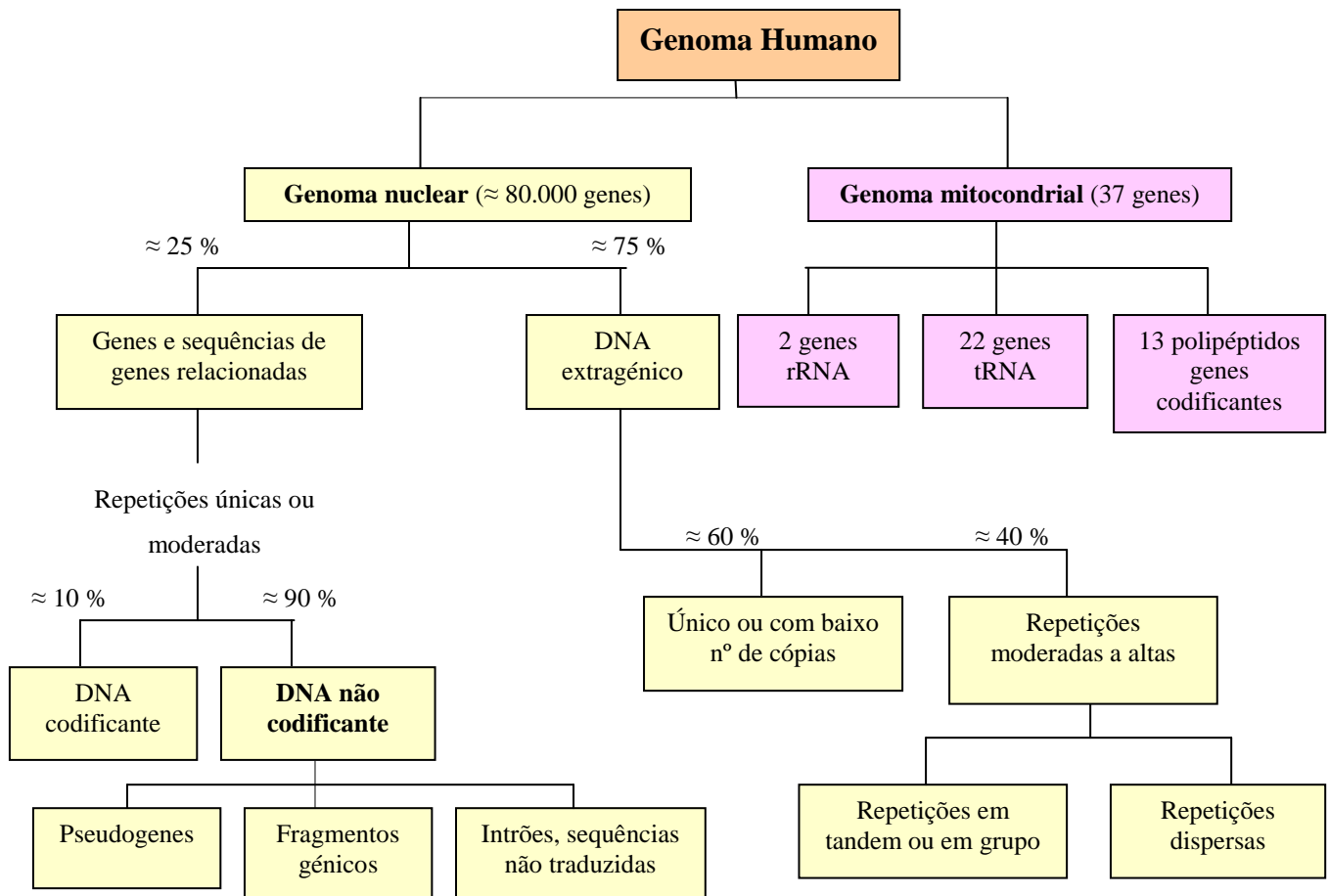


Figura 4 - Constituição do Genoma Humano (Adaptado de Brown, 2002).

2.2.1. *Genoma Nuclear*

Em 1974 descobriu-se que a hélice de DNA se enrolava à volta de um conjunto de proteínas pequenas e básicas, as histonas. Por sua vez, fragmentos com aproximadamente 200 pb dão duas voltas a um conjunto de 8 histonas, dando origem ao nucleossoma, a unidade organizativa básica. É devido a esta organização estrutural que todo o DNA nuclear se consegue organizar neste organelo celular (Videira, 2001). Os nucleossomas compactam, enrolando sobre si mesmos, dando origem aos solenóides. Estes, por sua vez, arranjam-se numa espiral formando os cromossomas, no máximo da sua compactação (Figura 5) (Videira, 2001 e Brown, 2002).

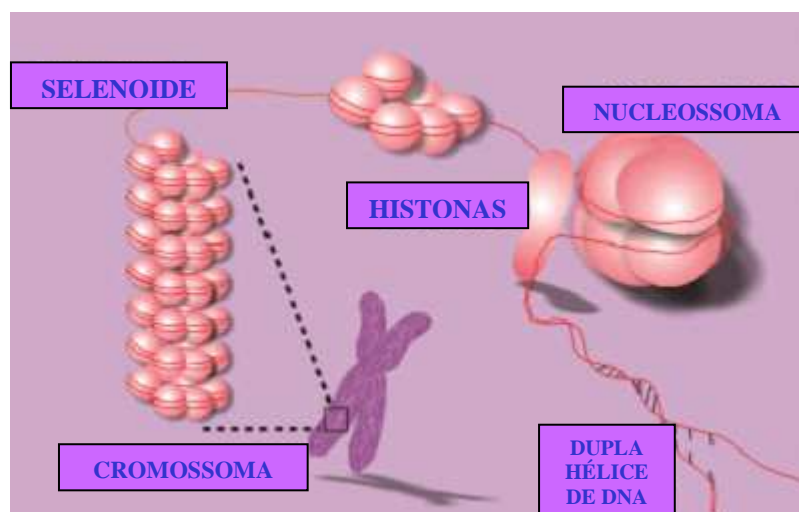


Figura 5 - Organização do Genoma Nuclear (Adaptado de <http://recursos.cnice.mec.es/iosfera/alumno,> 2008-11-05).

O genoma nuclear é distinto dos outros genomas, nomeadamente do de outros mamíferos ou de outros organismos complexos, por apresentar uma quantidade considerável de DNA repetitivo não codificante, genes com múltiplas cópias e fragmentos genéticos. O material genético dos cromossomas divide-se em regiões codificantes e não codificantes. Nas regiões codificantes encontram-se os genes que contêm a informação necessária à síntese proteica, constituídos por exões (regiões codificantes) e intrões (sequências estruturais). Os genes ocupam apenas 5 % do genoma humano e as **regiões não codificantes** ocupam os restantes 95 %. À semelhança de outros genomas complexos, um importante componente do genoma humano é o DNA não codificante (Videira, 2001).

À posição cromossómica de um gene ou de um marcador genético dá-se o nome de **locus**. Às diferentes formas de um gene, ou marcador genético, dá-se o nome de **alelo**. Se um indivíduo apresenta uma só forma alélica, para um determinado *locus*, diz-se homozigótico para esse *locus*. Se, por sua vez, apresentar dois alelos distintos diz-se heterozigótico. O genótipo é o resultado da análise dos alelos de um *locus*. À combinação dos genótipos para vários *loci* dá-se o nome de **perfil genético** (Brown, 2002).

Cada uma das células no corpo humano adulto tem a sua própria cópia ou cópias do genoma, as únicas exceções são um número reduzido de células, tais como os glóbulos vermelhos, que não apresentam núcleo no seu estado maturo. A grande maioria das células somáticas é diplóide, ao contrário das células sexuais ou gâmetas que são haplóides, cada

célula tem apenas 23 pares de cromossomas, um de cada autossoma e um cromossoma sexual (Figura 6) (Videira, 2001).

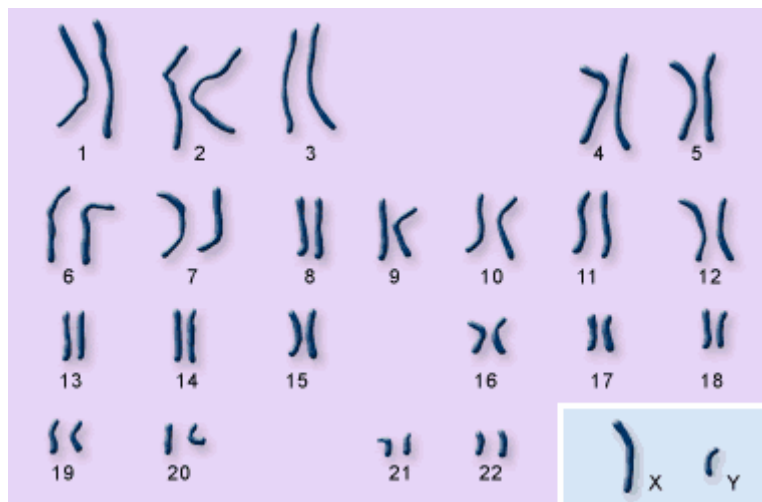


Figura 6 – Genoma Nuclear Humano (Adaptado de www.le.ac.uk, 2008-11-07).

O genoma nuclear humano é formado por sequências únicas e por sequências repetitivas. Estas sequências são individualizantes pelo tamanho das unidades de repetição e pelo número de repetições contínuas dessa sequência. Às regiões repetitivas do genoma, dá-se o nome de DNA satélite, sendo geralmente mais frequentes nas zonas próximas dos centrómeros. Quando a unidade de repetição apresenta um tamanho médio, designa-se de **minisatélite** ou VNTR, com 15 - 50 pb um tamanho total que pode variar entre 500 pb e 20 Kb. As regiões do DNA com unidades de repetição de 2 - 7 pb são chamadas de **microsatélites** ou STR (Tautz, 1993 e Pinheiro, 2008).

2.2.2. Genoma Mitochondrial

As mitocôndrias, organelos geradores de energia, contêm várias moléculas de DNA circular. Do genoma mitocondrial total, apenas uma pequena porção desempenha funções mitocondriais específicas, a maior parte dos polipeptídeos mitocondriais são codificados por genes nucleares e são sintetizados nos ribossomas citoplasmáticos antes de serem transportados para a mitocôndria (Brown, 2002).

Todas as células têm, cerca de 8.000 cópias do genoma mitocondrial, 10 ou mais em cada mitocôndria (Brown, 2002 e Pinheiro, 2008).

A sequência completa do genoma humano mitocondrial (Figura 7) tem 16.569 pb e é muito menor que o genoma nuclear contendo apenas 37 genes. Treze desses genes são responsáveis por muitos processos catabólicos fundamentais à obtenção de energia para a célula, tais como a β -oxidação de ácidos gordos, o ciclo de *Krebs* ou a cadeia respiratória. Os restantes 24 genes específicos são **não codificantes** e produtoras de moléculas de RNA, necessários para a expressão do genoma mitocondrial (Brown, 2002 e Pinheiro, 2008).

As duas cadeias que constituem o DNA mitocondrial são denominadas de cadeia pesada “H” (*Heavy*) e cadeia leve “L” (*Light*) devido a uma distribuição assimétrica de nucleótidos. A cadeia “pesada” contém mais guaninas (base azotada de maior peso molecular) do que as cadeias leves (Brown, 2002).

A sequência de DNA mitocondrial apresenta uma economia extrema de organização. Praticamente não existem bases não codificantes entre genes adjacentes, existindo apenas uma região com 1.122 pb, na qual não é possível identificar qualquer função codificante. Esta região é conhecida como região controlo, região não codificante ou *D-loop* (*Displacement loop*) (Brown, 2002 e Pinheiro, 2008).

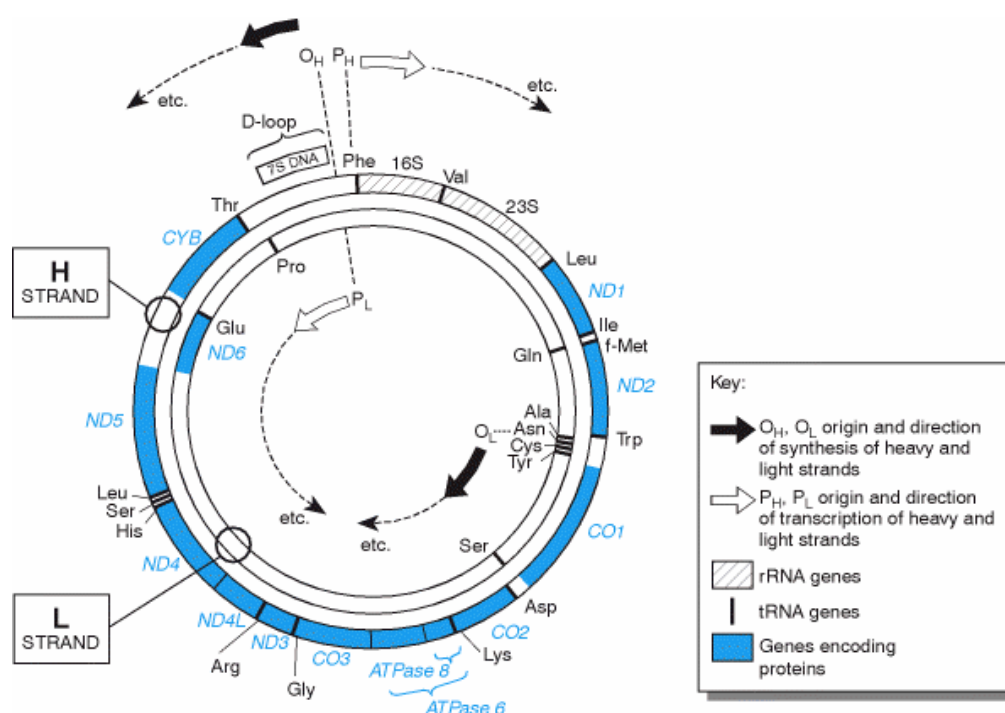


Figura 7 - Genoma mitocondrial Humano (Disponível em <http://biologia.uab.es>, 2008-11-05).

2.3. Investigação forense

Todo o processo que envolve a análise de amostras forenses torna-se imprescindível ao seu objectivo final, a identificação individual. As principais etapas do processamento de uma amostra forense são: a colheita do material a analisar, a extracção, a purificação/concentração e a quantificação do DNA, seguida da amplificação e análise dos fragmentos obtidos. O procedimento termina quando se faz a interpretação dos resultados obtidos. Estes resultados não são demonstrativos das características físicas ou psicológicas do indivíduo, uma vez que apenas se analisam as **regiões não codificantes** do genoma (Schuller *et al.*, 2001).

Em casos forenses, podem ser analisados vários tipos de vestígios biológicos, com especial predomínio de exsudados de diferentes origens e de sangue. Outras amostras, também frequentemente analisadas, são a saliva, os pêlos, os vestígios sublinguais e o material fecal. Estes vestígios têm em comum a presença de células que contêm moléculas de DNA, responsáveis pela informação genética (Pinheiro, 2008).

Apesar dos vestígios referidos serem os mais comuns e, também, em geral os mais fáceis de analisar, nem sempre são encontrados no local do crime. Por vezes, os únicos que se conseguem colher são extremamente difíceis de analisar, devido à baixa quantidade de DNA disponível. Entre estes, encontram-se os cabelos telogénicos e/ou sem raiz, os ossos antigos e os vestígios lofoscópicos (vestígios de contacto da pele, como as impressões digitais). Estas amostras são conhecidas como amostras **Low Copy Number** (LCN) (Gill, 2001).

Capítulo 3

Amostras degradadas

Amostras degradadas

Os vestígios biológicos envolvidos em casos com interesse forense mais frequentes são as manchas de sangue, normalmente relacionadas com homicídios, suicídios ou agressões físicas e o sémen relacionadas com agressões sexuais (Pinheiro, 2004). No entanto podem surgir outros vestígios biológicos, nomeadamente as manchas existentes em determinados suportes, como a madeira ou a terra, que proporcionam maus resultados, devido às características de absorção desses suportes, bem como à presença de fortes inibidores, factor importante aquando da PCR (Butler *et al.*, 2003).

3.1. Causas de degradação do DNA

As moléculas de DNA quando expostas a condições desfavoráveis podem começar a decompor-se, fenómeno que decorre devido a factores (Simón *et al.*, 2000; Butler, 2003 e Bonaccorso, 2004):

- i) biológicos: provocados pela contaminação e/ou degradação por parte dos microrganismos, nomeadamente as enzimas produzidas por fungos e bactérias, bem como pela actuação de nucleases de bactérias;
- ii) químicos: resultante de processos oxidativos provocados por reactivos químicos ou substâncias corrosivas. A exposição a raios ultra violeta e a utilização de conservantes, nomeadamente o formaldeído que fixa os ácidos nucleicos são, também, importantes factores de degradação do material genético;
- iii) ambientais: nomeadamente a luz e as elevadas temperaturas. Ainda que, uma temperatura de até 100 °C, não o destrói.

Todos estes factores são responsáveis pelas alterações da cadeia de polinucleótidos modificando a composição e a estrutura normal do seu DNA. Essas evidências estão, ainda, sujeitas às mais diversas formas de contaminação por material genético exógeno (Bonaccorso, 2004).

3.2. Possíveis danos na estrutura do DNA

A exposição de amostras forenses às condições do meio ambiente pode afectar a molécula de DNA, fragmentando-a, a ponto de tornar impossível a obtenção de um perfil genético (rotura do anel N-glicosídico) ou deteriorando-a parcialmente, gerando produtos capazes de inibir a PCR (danos hidrolíticos). Na natureza, estes dois processos podem actuar ao mesmo tempo, predominando um sobre o outro em função de numerosos factores como a temperatura, a humidade ou o pH (Pardo *et al.*, 1999).

A molécula de DNA pode ser afectada por **danos hidrolíticos e oxidativos**. Os danos hidrolíticos consistem na desaminação das bases, depurinação e depirimidinação (Figura 8) (Pardo *et al.*, 1999).

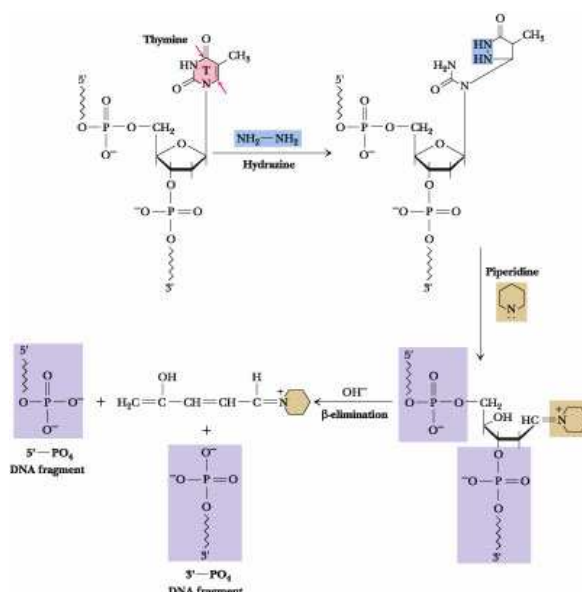


Figura 8 - Dano hidrolítico na molécula de DNA (Disponível em <http://web.virginia.edu/>, 2008-11-04).

Os **danos oxidativos** baseiam-se na radiação ionizante directa sobre a molécula de DNA, como a mediada por radicais livres originados pela radiação ionizante de moléculas de água. O dano oxidativo é produzido por radicais hidroxilo (OH^\cdot), ainda que existam outras espécies capazes de produzir este tipo de danos, como o electrão hidratado (e^-_{aq}) e os átomos de hidrogénio. De um modo geral, a reacção destas espécies com as bases de DNA

consiste na adição de um duplo vínculo destas moléculas dando origem a aductos. Também pode suceder que o radical hidroxilo retire um protão do grupo metilo da timina. Por isso, as reacções dos radicais com as bases produzem uma grande variedade de produtos a partir de cada base de DNA (Figura 9) (Pardo *et al.*, 1999).

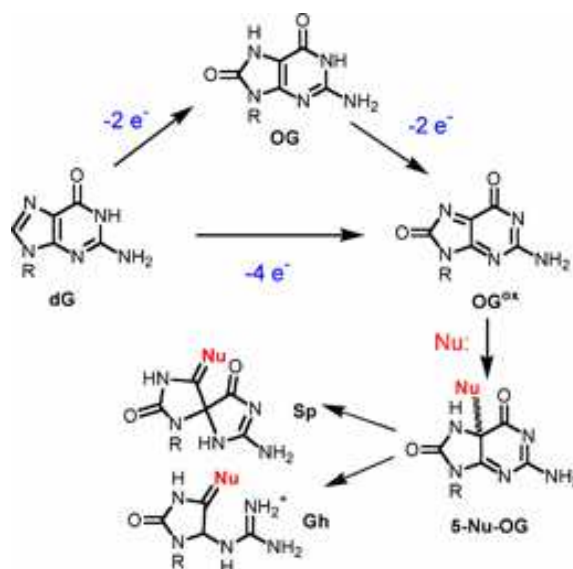


Figura 9 - Dano oxidativo numa das base azotada (Guanina) do DNA (Disponível em www.bioscience.utah.edu, 2008-11-04)

3.3. Amostras LCN

A análise forense está muitas vezes limitada à quantidade de amostra disponível. Nas amostras recolhidas podem encontrar-se apenas vestígios de DNA genómico com uma quantidade inferior a 200 pg, mas também podem surgir vestígios forenses com DNA altamente degradado (Gill *et al.*, 2006). Desta forma, é complicado obter um perfil genético utilizando o método de amplificação padrão STR do qual resultam apenas perfis parciais. Assim, com o intuito de melhorar os resultados obtidos têm vindo a surgir várias técnicas alternativas, nomeadamente a técnica LCN (Ballantyne *et al.*, 2007).

As amostras LCN contêm uma quantidade de DNA genómico inferior a 100 pg, o equivalente a, aproximadamente, 15 a 17 células diplóides, uma quantidade de material genético suficientemente baixo que não permite a sua análise com as condições aplicadas

às amostras com quantidade de DNA superior a 250 pg, consideradas normais (Gill *et al.*, 2001).

As amostras LCN podem surgir em diversos suportes, nomeadamente em suportes porosos e absorventes existentes no local do crime, como em sofás ou nas roupas das vítimas, ou em suportes não porosos, como paredes, vidro ou cerâmica. Os suportes podem, ou não, ser transportados, sendo que neste caso se torna necessária a sua transferência do suporte original para um suporte transportável. Uma metodologia imprescindível para o sucesso da análise é que as manchas sejam secas o mais rapidamente possível e acondicionadas de forma a preservar o seu material genético. Normalmente, utiliza-se uma zaragatoa humedecida com água ultrapura (*Milli-Q*), sendo a extracção efectuada a partir do segundo suporte (Van Oorschot *et al.*, 2003).

Algumas amostras caracteristicamente LCN são as impressões digitais. Balogh *et al.* (2003) mostram ser possível obter perfis de DNA de impressões digitais latentes deixadas por simples contacto da pele com qualquer superfície pela análise LCN.

O objectivo final de uma análise LNC é a obtenção de perfis que possam determinar a identificação de um indivíduo, ainda que possam surgir variações estocásticas (p. e.: *drop-out*, desequilíbrio heterozigótico ou contaminação) que dificultem a obtenção de um perfil completo (Balogh *et al.*, 2003 e Gill *et al.*, 2006).

Capítulo 4

Análise de amostras forenses

Análise de amostras forenses

4.1. Colheita de amostras forenses

Todas as amostras biológicas são potencialmente perigosas e por conseguinte devem ser manipuladas como tal. Desta forma, é essencial que a recolha de todo o material seja realizada por profissionais especialistas (Simón *et al.*, 2000 e Schuller *et al.*, 2001).

Segundo Schuller *et al.* (2001) um *kit* para a recolha de amostras para análise de DNA deve apresentar os seguintes elementos essenciais:

- Instruções precisas para a recolha das amostras.
- Uma lista de verificação precisa;
- Um sistema estéril para a recolha de amostras de células bucais, sangue ou cabelos;
- Selos, formulários e recipientes com números ou códigos de barras específicos;
- Luvas, batas e máscaras descartáveis;

O grupo de peritos da Interpol (2001) descreveu um conjunto de regras de recolha de amostras forenses, no qual refere um conjunto de directrizes essenciais à mínima contaminação (Schuller *et al.*, 2001):

- Sempre que possível, devem utilizar-se materiais estéreis e descartáveis na recolha das amostras;
- Utilizar máscara e touca;
- Desinfectar os contentores utilizados para o transporte das amostras, antes e depois da sua utilização;
- Limpar/desinfectar regularmente as bancadas de trabalho com clorohexidina.

O mesmo grupo de peritos estabeleceu, também, condições de conservação das amostras, nomeadamente as seguintes (Schuller *et al.*, 2001):

- Se as amostras se encontram congeladas, devem permanecer assim até à sua análise, sem nunca descongelar e congelar a mesma amostra, uma vez que degrada o DNA.
- As amostras, quando secas, devem conservar-se à temperatura ambiente sem contacto com a luz solar;
- A secagem das amostras deve fazer-se em zonas livres de contaminação, sempre que possível, num secador estéril;

Regras de protecção dos técnicos no laboratório de análise forense (Schuller *et al.*, 2001)

- Cobrir os cortes das mãos com pensos impermeáveis;
- Lavar as mãos várias vezes, especialmente quando se começa ou acaba uma tarefa;
- Usar roupa protectora impedindo o contacto directo do técnico com as amostras, nomeadamente luvas, máscara ou bata;
- Descartar todo o material utilizado segundo as normas de recolha de resíduos biológicos.

4.1.1. Colheita de amostras LCN

Os métodos de colheita amostras LCN são de extrema importância para o sucesso da sua análise, uma vez que é nesta fase que se efectua a primeira intervenção nas amostras. Se houver qualquer tipo de contaminação a este nível, todos os resultados serão irreversivelmente comprometidos (Lagoa e Pinheiro, 2008).

A técnica de colheita comumente utilizada requer duas zaragatoas (Figura 10). A primeira zaragatoa deve ser humedecida com água estéril para aumentar a eficiência da colheita, a segunda zaragatoa deve ser seca, permitindo que as células, hidratadas pela zaragatoa húmida, possam ser totalmente recuperadas, por capilaridade, na segunda colheita. Este procedimento é particularmente importante quando se analisam amostras

LCN (Van Oorschot *et al.*, 2003). Segundo Pang e Cheung (2007) este método permite a recolha de células suficientes à obtenção do perfil completo da amostra.

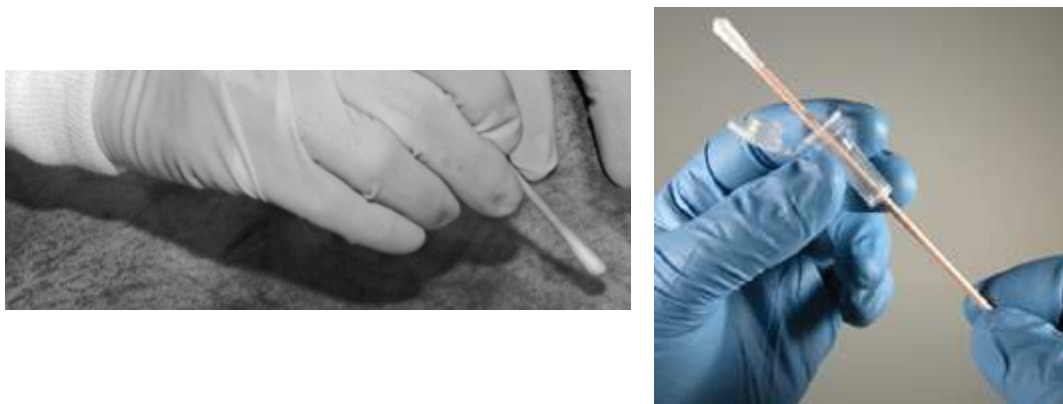


Figura 10 - Colheita de amostras com uma zaragatoa (Disponível em www.evidentcrimescene.com, 2008-11-04).

Leemans *et al.* (2006) publicaram um estudo onde comparavam a recolha de amostras LCN mediante três métodos diferentes, o *cellotape*, a gaze e a zaragatoa. Quando recorreram à utilização da zaragatoa para recolha das amostras empregaram, também, o método da “dupla zaragatoa”. Os autores testaram a utilização de uma zaragatoa embebida em soro fisiológico e em tampão de lise (ALT; *Qiagen*). O *cellotape* e a gaze foram também embebidos em soro fisiológico antes da recolha das amostras. Este estudo permitiu demonstrar que a utilização do método da “dupla zaragatoa” é preferível ao *cellotape* e à gaze uma vez que resulta numa maior quantidade de DNA recolhido. Esta investigação permitiu concluir ainda que a utilização do tampão de lise (ATL), em vez do soro fisiológica para a recuperação de células de impressões digitais, não aumenta a quantidade de DNA recolhido, mesmo quanto a zaragatoa foi armazenada à temperatura ambiente durante várias semanas.

4.2. Extração de DNA

Van Oorschot *et al.* (2003) referiram que a quantidade de DNA que se extrai é consideravelmente menor que o esperado, o que poderá significar que muito do DNA é perdido durante o processo de colheita e extração do material genético. Normalmente, em casos forenses, as amostras a analisar têm quantidades vestigiais de material genético, por

isso é necessário seguir protocolos rigorosos de colheita e extracção, uma vez que a eliminação de uma ínfima quantidade de DNA pode significar a perda irreparável da amostra.

Gill *et al.* (2000) referem que um laboratório de extracção de DNA deve ter o mínimo de contaminação a fim de evitar potenciais erros na extracção.

4.2.1. Precauções num laboratório de análise forense

Para uma correcta extracção de DNA torna-se imprescindível que um laboratório forense se mantenha isento de qualquer contaminante que possa por em causa o resultado final da investigação. Um dos pontos-chave de um laboratório forense é o manuseio de instrumentação estéril.

Béraud-Colomb *et al.* (1995) descreveram detalhadamente as precauções que devem ser tomadas para minimizar potenciais contaminações por DNA exógeno, nomeadamente:

- realizar as extracções de DNA em locais isentos de qualquer material de uma extracção prévia;
- separar, fisicamente, os procedimentos pré e pós-PCR;
- esterilizar e filtrar todos os tampões utilizados;
- utilizar pipetas de precisão e descontaminar as áreas de trabalho com radiação UV;
- utilizar sempre controlos negativos;
- realizar extracções em duplicado, sempre que possível.

Os materiais devem ser rigorosamente esterilizados utilizando HCl ou através da exposição a radiação UV. As áreas de trabalho devem encontrar-se fisicamente delimitadas e, sempre que possível, deve utilizar-se a câmara de fluxo laminar (Figura 11) (Schuller *et al.*, 2001).



Figura 11 - Câmara de fluxo laminar (Disponível em www.fisherbioservices.com/img/specimen.jpg, 2008-11-04).

A utilização do HCl produz a lise ácida do DNA, enquanto que a radiação UV tem por objectivo a formação de produtos covalentes que não interfiram com a reacção em cadeia da polimerase (Pardo *et al.*, 1999 e Schuller *et al.*, 2001).

A delimitação de áreas de trabalho, isto é, a separação das áreas de extracção e amplificação do DNA, pretende anular, ou pelo menos minimizar a possibilidade de contaminações cruzadas, provenientes de manipulações anteriores. Por outro lado, as câmaras de fluxo laminar são elementos imprescindíveis para impedirem a contaminação das amostras biológicas na área de trabalho (Pardo *et al.*, 1999 e Schuller *et al.*, 2001).

O grupo de peritos da Interpol, em 2001 referem que se devem utilizar desinfectantes comerciais concentrados quando se derramam materiais biológicos potencialmente perigosos. O desinfectante deve permanecer em contacto com a zona contaminada antes de lavar e secar. O organismo mencionado defende que, por exemplo, para a desinfecção das bancadas de trabalho depois de manipular amostras biológicas deve-se usar uma diluição de 1:10 de um desinfectante comercial concentrado, como por exemplo o *MicroSol 3'* (Anachem) (Figura 12)¹. No entanto, é de referir que este tipo de soluções perde a sua eficácia ao fim de poucos dias, pelo que é recomendada uma utilização regular (Schuller *et al.*, 2001).

¹ Disponível em www.pharmaceutical-int.com, 2008-11-02.



Figura 12 - Desinfetante MicroSol 3¹ (Disponível em www.pharmaceutical-int.com, 2008-11-04)

Gill *et al.* (2000) mencionam ainda que o laboratório onde se realiza a extracção de DNA de baixo peso molecular, deve ser equipado, idealmente, com filtros *HEPA*² e deve ser mantido a pressão positiva. Os filtros *HEPA* caracterizam-se por separarem aerossóis, pós-tóxicos e bactérias de até 0,3 μm . É necessária ainda uma descontaminação com radiação ultravioleta sempre que se termina o trabalho e relata, ainda, que qualquer técnico de laboratório deve usar batas e máscara descartáveis a fim de evitar contaminações cruzadas.

4.2.2. Métodos de extracção de DNA

O DNA pode ser extraído de várias amostras forenses, nomeadamente do sangue, da saliva, do sêmen ou dos pêlos, sendo característica fundamental destas amostras a presença de células nucleadas, uma vez que é destas células que se extrai o DNA a analisar. A nível da investigação criminal, o sangue é a amostra forense mais utilizada, no entanto nem todas as células sanguíneas são utilizadas numa investigação forense, apenas os leucócitos, as células nucleadas do sangue, são retiradas e é a partir destas células que se extrai o DNA (Pinheiro, 2008).

² Disponível em <http://www.sofiltro.com.br/filtrosar.htm>, 2008-11-02.

4.2.2.1. Extracção de amostras LCN

A extracção do DNA pode ser realizada utilizando vários protocolos, uns mais complexos que outros, dependendo das características das amostras de onde o DNA é extraído, no entanto, existe um consenso generalizado na utilização do **Chelex** e da **extracção orgânica** como métodos de excelência na recuperação de amostras LCN.

Elliot *et al.* (2003) demonstraram que a utilização da *microdissecção a laser* (LMD - *laser microdissection*) permitia uma maior eficácia na análise de um número reduzido de células. Este método possibilita o isolamento de células de uma amostra, para que apenas estas fossem analisadas, eliminando todo o *background* que normalmente não tem interesse.

Schiffner *et al.* (2005) referem que os passos necessários à extracção, nomeadamente a mudança de tubos, pode levar a uma perda considerável de amostra (cerca de 20 a 76 %). Os mesmos autores estudaram vários protocolos de extracção, comparando a quantidade de DNA que era possível recuperar concluindo que, para amostras LCN os protocolos mais simples, que envolviam menor manipulação da amostra, proporcionavam melhores resultados do que os protocolos mais complexos, em que a extracção implicava maior manipulação das amostras.

Nos estudos realizados por Schiffner *et al.* (2005) e Romano *et al.* (2006) ficou demonstrado ser produtiva uma purificação seguida da concentração do DNA extraído para se obter uma maior quantidade de DNA disponível, nomeadamente quando se analisam amostras LCN.

Schiffner *et al.* (2005) referem que a purificação do DNA pode ser efectuada através da utilização da enzima *RNA Polimerase A* (*RNA Poly A*) e a sua concentração com filtros *Microcon* de diferentes porosidades. Um exemplo de um protocolo optimizado que utiliza uma metodologia simples inclui a utilização de SDS e protease K (Schiffner *et al.*, 2005):

- A - Incubar a amostra com SDS a 0,01 % com protease K a, aproximadamente, 56 °C, durante 30 minutos;
- B - Incubar a solução durante 10 minutos a 100 °C;
- C - Concentrar o DNA num filtro *Microcon*® 100 (*Millipore*);
- D - Adicionar e RNA Polimerase A ao filtro.

De uma forma geral, os métodos de extracção de amostras biológicas implicam o uso de detergentes e de enzimas proteolíticas. Enquanto os detergentes são usados para solubilizar os componentes celulares, as enzimas proteolíticas determinam a digestão de proteínas, nomeadamente as histonas, que de outra forma permaneceriam fortemente ligadas ao DNA, dificultando a sua extracção. O detergente mais comumente utilizado é o SDS, trata-se de um detergente aniónico que se liga à maioria das proteínas e permite solubilizar os vários componentes celulares. A protease K é uma enzima proteolítica e, simultaneamente com o SDS remove grande parte das nucleases ou outras proteínas celulares, no entanto, são fortes inibidores da PCR, como tal é necessário um passo fundamental de purificação para garantir uma amplificação eficaz. Esta inactivação deve ser realizada aumentando a temperatura da reacção até, aproximadamente, 100 °C, durante alguns minutos (\approx 10 minutos) (Pardo *et al.*, 1999).

As placas de filtração *Microcon* (Figura 13) utilizam uma membrana de exclusão por tamanho e uma filtração por vácuo para permitir um protocolo com poucos passos, não necessitando, desta forma de recorrer a centrifugações nem precipitações, minimizando a perda de amostra³.



Figura 13 - Filtro *Microcon* (Disponível em <http://www.komabiotech.co.kr/product/molecular>, 2008-11-25).

O processo de manipulação das amostras descrito pode ser completado com outros passos de purificação, permitindo desta forma retirar o excesso de proteínas residuais. Os métodos característicos de extracção de DNA são a reacção *Chelex* e a extracção orgânica envolvendo fenol: clorofórmio.

³ Disponível em www.millipore.com/genomics, 2008-11-02.

O método **Chelex** utiliza um reagente com alta afinidade para os iões metálicos que podem causar danos na cadeia de DNA (Pardo *et al.*, 1999). Este protocolo utiliza uma metodologia simples e rápida que implica uma única incubação da amostra numa solução de 5 % de resina, normalmente a 56 °C durante 1 hora com variações de tempo e temperatura. Este método é, também vantajoso por não recorrer ao uso de tóxicos. Esta metodologia foi também utilizada por Romano *et al.* (2006) para extracção de amostras LCN de pontas de cigarros. Estes autores demonstraram que a extracção e purificação do DNA utilizando a técnica de **Chelex** e os filtros **Microcon** YM-100 e YM-30, respectivamente, aumentam significativamente o DNA disponível. No entanto, segundo Ng *et al.* (2007) esta técnica apresenta uma desvantagem importante uma vez que não elimina os inibidores da PCR, por utilizar o extracto celular total.

A **extracção orgânica**, contrariamente ao **Chelex**, pode sofrer uma perda significativa na recuperação DNA em resultado das múltiplas centrifugações e passos de transferência de material genético necessários ao processo (Ng *et al.*, 2007). No entanto, outros autores referem, que mesmo com as desvantagens mencionadas, esta metodologia pode ser usada quando se analisam amostras em precárias condições de conservação (Schiffner, 2005; Swango, 2006 e Turrina, 2008).

A utilização de protocolos mais complexos, como por exemplo, o **DNA IQTM** (Promega) e o **QiaAmp** (Qiagen) leva, muitas vezes, a que grande parte do DNA da amostra fique retido nas paredes dos tubos ou nas colunas usadas para a sua purificação e concentração (Schiffner *et al.*, 2005 e Romano *et al.*, 2006).

O kit comercial **DNA IQTM** baseia-se na afinidade do DNA para a sílica sob a forma de uma resina paramagnética, enquanto que na coluna **QiaAmp** a afinidade do DNA é para uma membrana. Diferentemente do último método mencionado que exige múltiplas centrifugações, o sistema **DNA IQTM** utiliza um suporte magnético para facilitar a separação da resina, de lavagens e de lisados (Romano *et al.*, 2006 e Ng *et al.*, 2007).

Schiffner *et al.* (2005) comparam um método de extracção simples e dois kits comerciais para amostras LCN. As amostras utilizadas foram diluídas com diferentes quantidades de DNA às quais se adicionou protease K e uma mistura de: SDS, **Chelex[®]100**, água e esferas. A extracção destas amostras de DNA foi também realizada com os dois kits comerciais já referidos: o **DNA IQTM** e o **QiaAmp**. Estes autores demonstraram que as amostras tratadas com protease K e SDS, bem como as tratadas com

Chelex[®]100 se tornavam vantajosas uma vez que envolviam menos transferências de amostra entre tubos. Concluíram ainda que, substituindo o *Chelex* por EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*), se obtinham resultados significativamente inferiores, o que significaria que o EDTA não permite uma remoção expressiva de DNA, além de que poderia ser um possível inibidor das posteriores amplificações.

Lemmans *et al.* (2006) publicaram os resultados de um estudo onde utilizaram quatro diferentes métodos de extracção de DNA de acordo com os procedimentos descritos pelos fabricantes para extracção de amostras LCN de impressões digitais: ***QIAamp DNA Mini Kit*** (*Qiagen*), ***QIAquick PCR Purification Kit*** (*Qiagen*), uma combinação de ambos os kits após a ligação do DNA às colunas do ***QIAamp DNA Mini Kit*** e do ***QIAquick PCR Purification Kit*** e o ***ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit*** (“CST”; *Invitrogen*).

Todos os autores atrás referenciados demonstram que os métodos que exigem menos manipulação e por consequência, menos possibilidade de perda de amostra apresentam resultados mais fiáveis. Concluíram ainda que a digestão da amostra seguida da sua concentração e purificação é o procedimento mais eficaz e que permite uma minimização da perda de amostra e, consequentemente o aumento do poder de amplificação. (Elliot *et al.*, 2003; Schiffner *et al.*, 2005 e Ng *et al.*, 2007).

4.3. Quantificação do DNA extraído

4.3.1. Polimerase Chain Reaction

A PCR foi descrita pela primeira vez em 1985, por Kary Mullis que, em 1993, recebeu o prémio Nobel da Química pela sua obra científica. Trata-se de um método extremamente eficaz na avaliação da individualidade humana. Ela permite a amplificação selectiva, *in vitro*, da sequência específica do DNA alvo que se deseja estudar. O princípio da reacção baseia-se no conhecimento da sequência do DNA alvo e em reacções bioquímicas simples (Jeffreys *et al.*, 1985).

A reacção de PCR necessita essencialmente da presença da sequência de DNA alvo, de um conjunto de *primers*, de nucleótidos e de uma DNA polimerase. A *Taq* polimerase, a mais comum DNA polimerase, é termoestável uma vez que resiste bem às

variações de temperatura que decorrem da PCR. Normalmente, a maioria das DNA polimerases disponíveis no mercado são fornecidas conjuntamente com uma solução tampão específica, cuja composição varia de acordo com o fabricante. Basicamente, estas soluções contêm iões diversos (Na^+ , Cl^- , K^+) que optimizam as condições de reacção. Alguns tampões contêm ainda detergentes (*Tween 20*, *Triton X-100*, *Nonidet P-40*), inibindo a formação de dímeros das cadeias enzimáticas, proteínas estabilizantes (*Bovine Serum Albumin* - *BSA*) e algumas substâncias que intervêm na desnaturação da cadeia molde de DNA (*Dithiothreitol* - *DTT*, β -mercaptoetanol), quebrando as pontes de hidrogénio entre as bases. Um reagente de importância crítica é o MgCl_2 , doador muito estável de iões Mg^{2+} , que são co-factores indispensáveis à actividade da enzima (Jeffreys, 1985).

A reacção básica da PCR consiste numa série de ciclos, cada um dos quais envolve reacções a temperaturas diferentes. A $95\text{ }^\circ\text{C}$ dá-se a desnaturação das cadeias duplas, segue-se o emparelhamento dos *primers* que flanqueiam o DNA (a uma temperatura de, aproximadamente, $55\text{ }^\circ\text{C}$). Finalmente, é feita a síntese do DNA pela actuação da *Taq* polimerase a uma temperatura de, aproximadamente $72\text{ }^\circ\text{C}$. Assim, a cada n ciclos há uma produção de 2^n moléculas de DNA (Figura 14) (Videira, 2001 e Butler, 2003).

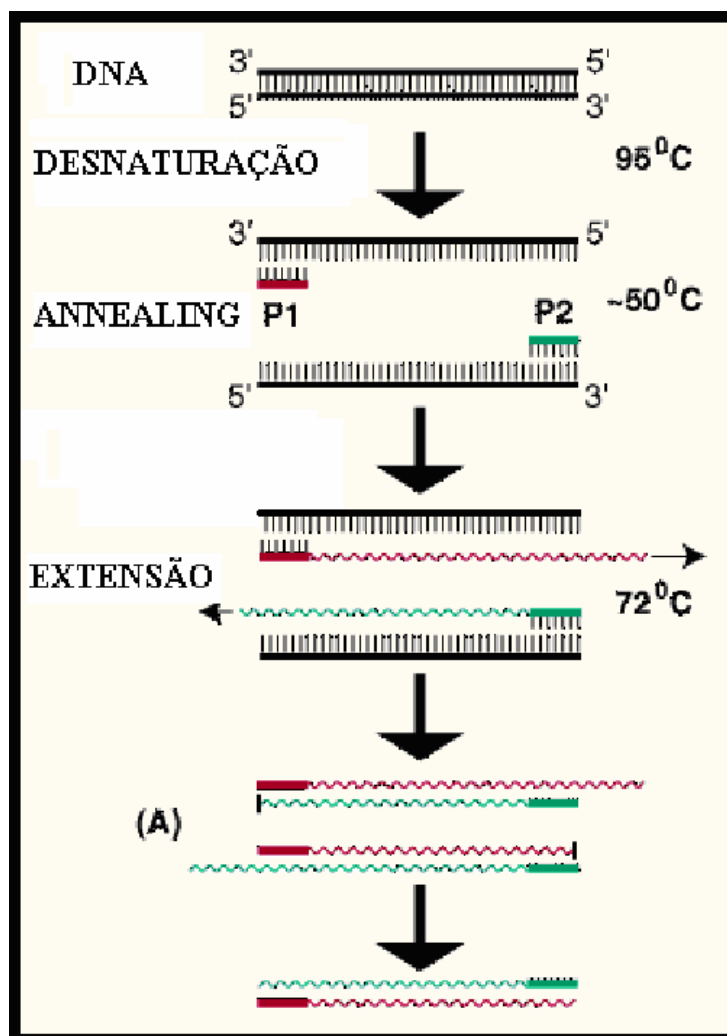


Figura 14 -Extensão dos *primers* (Adaptado de McPherson, 1991).

A identificação dos fragmentos amplificados é realizada após electroforese capilar, seguida de detecção de um sinal fluorescente que acontece quando se marcam os *primers* com fluorocromos. Desta forma, podem usar-se analisadores de DNA (sequenciadores automáticos) que identificam os fragmentos por intermédio de um laser. Um computador com um programa específico que permite observar curvas ou picos de DNA que são posteriormente analisados (Lagoa e Pinheiro, 2008).

A amplificação simultânea de *loci* STR mediante a técnica de **PCR multiplex** e a detecção automática dos fragmentos de DNA torna possível um sistema de análise rápido e sensível que permite aproveitar ao máximo as amostras e tem um alto poder de discriminação (Schuller *et al.*, 2001). Os avanços na genética permitiram, através de novos

testes, a redução do tamanho das regiões amplificadas, ou seja, reduziram-se os fragmentos a serem detectados (Coble e Butler, 2005 e Coble *et al.*, 2006).

Vários autores realizaram estudos utilizando um aumento do número de ciclos da PCR como método de escolha para a análise de amostras LCN (Gill *et al.*, 1994; Burger *et al.*, 1999; Capelli *et al.*, 2003 e Schmerer *et al.*, 1999).

Aumento do número de ciclos em amostras forenses

O aumento do número de ciclos tem sido uma estratégia amplamente utilizada na análise de amostras forenses, uma vez que o tradicional método pode não ser suficiente para a amplificação de amostras LCN. Gill *et al.* (1994) recorreram ao aumento do número de ciclos para resolver o caso da família Romanov.

Findley *et al.* (1997) demonstraram que uma única célula podia ser analisada quando se aumentava o número de ciclos da PCR de 28 para 34 usando **sistemas *multiplex* de segunda geração (SGM - Second-generation systems multiplex)**. Esta alteração na síntese leva a um número exponencial de cópias das moléculas de DNA inicial dificultando a interpretação dos resultados, principalmente devido à formação de alguns artefactos. Burger *et al.* (1999), Schmerer *et al.* (1999) e Capelli *et al.* (2003) aplicaram esta técnica quando analisaram estudos de antropólogos na análise de DNA de ossos antigos.

Os vários estudos que foram surgindo demonstram que ainda não é consensual o número de ciclos ideal a uma boa amplificação. Gill *et al.* (1994) utilizaram 38 a 43 ciclos de amplificação, enquanto Van Hoosfstat *et al.* (1998), Schmerer *et al.* (1999) e Burger *et al.* (1999) utilizaram 50 a 60 ciclos.

Na tentativa de definir o número ideal de ciclos que permita a análise amostras “problema”, nomeadamente amostras LCN, vários autores realizaram estudos onde demonstram que a utilização de 34 ciclos de PCR oferece melhores resultados que os normais 28 ciclos de amplificação da PCR tradicional, não havendo melhorias significativas quando se utilizava um número superior a 34 ciclos. Estes estudos demonstraram ainda uma relação favorável entre a qualidade dos resultados e a sensibilidade do método (Wiegand *et al.*, 2000 e Kloosterman e Kersbergen, 2003).

Gill *et al.* (2000) demonstraram que o aumento da sensibilidade proveniente do aumento do número de ciclos de amplificação está, directamente relacionado com a diminuição da quantidade de perfis obtidos. Quando se verifica esta redução, observa-se o aumento de artefactos e produtos *stutters*. Este estudo foi realizado utilizando o *AMPF ℓ STR SGM plusTM* como método de amplificação do DNA com menos de 100 pg.

Budowle *et al.* (2001) e Leclair *et al.* (2003) referem um conjunto de alterações a esta metodologia:

- i) reduzir o volume da PCR, de forma a se obterem produtos de amplificação mais concentrados;
- ii) filtrar os produtos da PCR de forma a remover os iões que competem com os produtos de amplificação quando estes são injectados nos capilares;
- iii) usar formamida de baixa condutividade;
- iv) adicionar mais produto amplificado para análise no sequenciador;
- v) aumentar o tempo de injeção no capilar.

Apesar de todas estas condições é também necessário aumentar o número de ciclos da PCR para se obterem resultados conclusivos. Além disso, tem-se verificado que, mais uma vez, os artefactos característicos deste tipo de amostras não são eliminados e que se existirem inibidores, há maior probabilidade que, também, estes sejam amplificados, levando à inibição da reacção de PCR (Budowle *et al.*, 2001 e Leclair *et al.*, 2003).

Mais recentemente, Coble e Butler (2005) demonstraram que a duplicação da quantidade de DNA polimerase, aumenta a sensibilidade do método.

Apesar do aumento do número de ciclos da PCR engrandecer a sensibilidade do método, quando se trata de análise LCN, há maior produção de artefactos principalmente os derivados de variações estocásticas (como, por exemplo, o *allele dropout* e o desequilíbrio heterozigótico). Assim, têm surgido algumas alternativas a esta técnica, tais como o **Nested PCR** e a **WGA** (*Whole Genome Amplification*) (Lagoa, 2007).

Nested-PCR

Um dos métodos amplamente utilizados na análise LCN tem sido o *Nested-PCR* (Figura 15) (Strom e Rechitky, 1998). Trata-se de um método de alta sensibilidade que utiliza um conjunto de *primers* em duas reacções de PCR distintas mas consecutivas. Na primeira reacção é amplificada a zona de repetição STR e uma região adjacente, onde se ligam os *primers*. Na segunda reacção são usados *primers* desenhados com o objectivo de se obter um produto de amplificação mais pequeno, utilizando como amostra uma alíquota do produto da primeira reacção. Esta técnica reduz a quantidade de produtos não específicos e permite analisar quantidades ínfimas de DNA (Gill *et al.*, 2000).

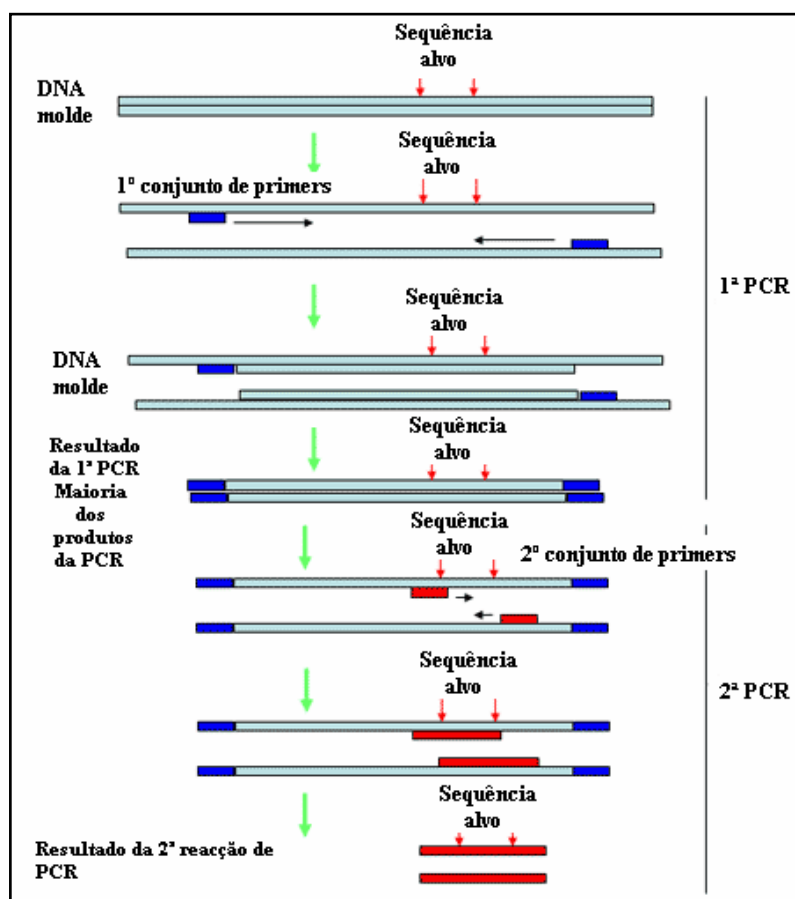


Figura 15 - *Nested* PCR (Adaptado de www.pcrstation.com, 2008-11-05).

É importante salientar que, mediante o *kit* de amplificação que se utiliza, o número de ciclos pode variar de forma a se poder obter o mesmo grau de sensibilidade. Estudos realizados por Schiffner *et al.* (2005) demonstraram que, comparando os dois *kits* mais utilizados em análise forense, o *AmpFℓSTR®Identifiler™* (*Applied Biosystems*) e o *Powerplex®16* (*Promega*), o último requer um maior número de ciclos, uma vez que apresenta menor concentração de *primers* e menor concentração de *Taq* DNA Polimerase. Deste modo, em condições LCN, o *Powerplex®16* necessitará de mais ciclos para proporcionar a mesma sensibilidade que o *AmpFℓSTR®Identifiler™*.

Um *kit* actualmente utilizado e que tem como base a reacção de *Nested PCR* é o *AMPFℓSTR SGM plus™ multiplex*. Numa primeira fase, a amostra é amplificada utilizando *AMPFℓSTR SGM plus™ multiplex* com 28 ciclos. O produto final desta reacção serve como amostra da segunda reacção que utiliza os mesmos 28 ciclos com os reagentes do *AMPFℓSTR SGM plus™* (Gill *et al.*, 2000).

WGA - Whole Genome Amplification

Um outro método de análise de amostras LCN é a **amplificação total do genoma** (**WGA - Whole Genome Amplification**), anterior à amplificação específica dos *loci* que se pretende analisar. Este método permite aumentar a quantidade de DNA inicial de amostras LCN, sendo que vários estudos demonstraram que a aplicação da técnica WGA a quantidades exíguas de DNA, antes da amplificação específica do *loci*, aumenta o sucesso da sua análise (Schneider *et al.*, 2004; Hanson e Ballantyne, 2005 e Ballantyne *et al.*, 2007).

Ballantyne *et al.* (2007) concluiu que a amplificação total do genoma (WGA) associado à utilização de amostras LCN em amostras degradadas resulta numa significativa melhoria de resultados.

A grande desvantagem da técnica WGA é o facto de não minimizar os artefactos provocados pela variação estocástica, característicos das amostras LCN (Gill *et al.*, 2005).

Ballantyne *et al.* (2007) mostraram também que a aplicação da WGA a impressões digitais caracterizadas por apresentarem quantidades ínfimas de DNA, sendo maioritariamente degradado, permitia a obtenção de melhores resultados do que com a análise normal. Os mesmos autores publicaram ainda os resultados de investigações

realizadas utilizando o *kits* comercial *GenomePlex™ WGA* (Sigma) utilizado para amplificar amostras LCN e amostras de DNA degradado. O *kit GenomePlex™ WGA* utiliza um método baseado na técnica PCR, envolvendo fragmentação do DNA genómico, após a ligação dos *primers*. Esta técnica utiliza um volume 10 ng de ADN alvo. O fabricante informa que uma só célula ou DNA altamente degradado podem ser amplificados com alta precisão.

PCR em Tempo real

A RT-PCR (Figura 16) é uma técnica com a capacidade de monitorizar o progresso da PCR tal como ela ocorre, ou seja, em tempo real. Os dados recolhidos durante todo o processo de PCR são visualizados ao longo do mesmo, ao contrário da PCR tradicional onde os resultados apenas se visualizam no final da reacção. Esta forma completamente revolucionária de abordar a PCR permite quantificar o DNA alvo em tempo real. Quanto maior o número inicial de cópias do DNA alvo mais rapidamente é observado um aumento significativo da fluorescência. Ao contrário da PCR em tempo real, a PCR tradicional é pouco precisa, de baixa sensibilidade e resolução e não automática. Os resultados não são quantitativos e a electroforese apenas pode ser processada após o final da reacção. A PCR em tempo real recolhe os dados na fase exponencial e o aumento do sinal fluorescente é directamente proporcional ao número de *amplicons* gerado⁴.

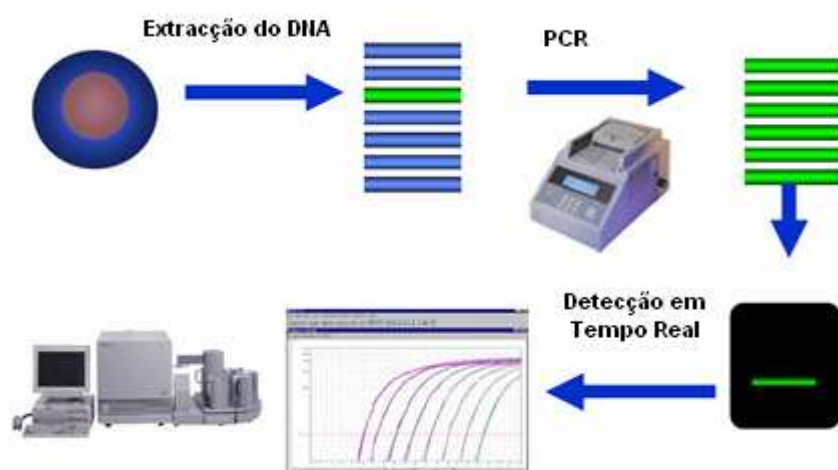


Figura 16 - Evolução da PCR em Tempo Real (Adaptado de www.appliedbiosystems.com, 2008-11-07).

⁴ Disponível em www.appliedbiosystems.com, 02-11-2008).

A PCR quantitativa (qPCR) em tempo real tem sido o método de escolha para a quantificação de DNA. As principais características da qPCR, particularmente importantes para aplicações forenses, prendem-se principalmente com a capacidade de quantificação do genoma de interesse e da sensibilidade de detecção de apenas algumas cópias ou mesmo uma única cópia de DNA alvo. Os protocolos experimentais para a qPCR em tempo real são simples, poupam trabalho e facilitam a automatização. Têm, ainda, um elevado grau de sensibilidade e especificidade permitindo a quantificação absoluta do DNA alvo (Swango, 2006 e Romano *et al.*, 2006).

O número crescente de sistemas de tipagem de DNA e a diminuição da quantidade de DNA que chega aos laboratórios forenses tem vindo a impulsionar o desenvolvimento de várias PCR quantitativas em Tempo Real. Esta metodologia pode ser realizada em ensaios *multiplex* que quantificam, simultaneamente, mais de um alvo de uma amostra, oferecendo a possibilidade de poupar tempo, trabalho e DNA extraído (Swango, 2006 e Hudlow, 2008).

Hudlow (2008) realizou estudos utilizando um ensaio *quadruplex* de qPCR em tempo real que avalia, em simultâneo, o DNA humano total, o DNA humano masculino, o DNA degradado e os possíveis inibidores da PCR, reformulando, assim, a metodologia *triplex* qPCR em tempo real que não determinava o DNA masculino da amostra. A metodologia *quadruplex* permite uma maior racionalização do material a analisar, permitindo a utilização de uma amostra limitada, deixando cair em desuso a análise de SNP, *ALU-repeats*, WGA e tipagens do mtDNA. Pode concluir-se então, que a utilização do ensaio *quadruplex* qPCR em tempo real tem a capacidade de determinar, com precisão, a quantidade de DNA presente numa amostra forense e, simultaneamente, determinar os sistemas de digitação mais adequados, aumentando assim a eficiência da análise de amostras limitadas (Hudlow, 2008).

4.3.1.1. Inibidores da PCR

A purificação do DNA de substância inibidoras da PCR é um dos primeiros e mais importantes problemas no estudo do DNA (Pardo *et al.*, 1999).

Contaminantes da amostra de DNA podem dificultar fortemente a reacção de PCR, funcionando como inibidores da DNA Polimerase. Estes inibidores podem ser encontrados em qualquer amostra forense, nomeadamente nos componentes da própria amostra ou nos locais onde essas amostras são encontradas (Pinheiro, 2008).

Constituintes do solo

Alguns componentes do solo, local onde são frequentemente encontradas amostras biológicas de interesse forense, podem ser considerados fortes inibidores da PCR, nomeadamente os **ácidos húmicos e fúlvicos** (Pardo *et al.*, 1999 e Ballantyne *et al.*, 2007). Os ácidos húmicos são compostos de coloração escura, formados pela associação de macromoléculas heterogéneas contendo grupos polifuncionais de alto peso molecular. Por se tratar de uma matriz complexa que varia a sua composição, dependendo da sua origem (animal, vegetal e microbiológica) a estrutura destes ácidos ainda não está totalmente elucidada. Estas moléculas podem não ser completamente eliminadas durante o processo de purificação tornando-se fortes inibidores da PCR. Os ácidos fúlvicos podem extrair-se com hidróxido de sódio, enquanto que para extrair os ácidos húmicos é necessário recorrer à actuação do HCl. A extracção destes componentes pode ser avaliada mediante electroforese em gel de acrilamida uma vez que apresentam características fluorescentes (Pardo *et al.*, 1999).

Hemoglobina

No que concerne às amostras biológicas, é de salientar que, para a análise de sangue periférico, se torna necessário ter em conta um conjunto de cuidados a fim de minimizar os inibidores da PCR. Segundo Ballantyne *et al.* (2007) a hemoglobina (Figura 17) pode inibir a PCR, já que os iões Fe^{2+} são competidores dos iões de Mg^{2+} , necessários à acção da DNA polimerase. Tais inibidores parecem ser resistentes à fervura, não destruídos pelas proteases e não solúveis em solventes orgânicos.

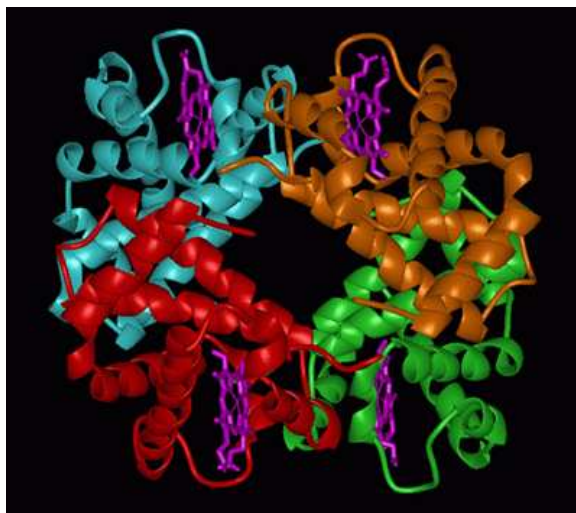


Figura 17 - Molécula de Hemoglobina (Disponível em: www.qca.ibilce.unesp.br, 2008-11-07)

Porfirinas

As porfirinas (Figura 18) e seus derivados são também conhecidos como inibidores da PCR. As mais abundantes são as protoporfirinas que contêm quatro grupos metilo, dois grupos vinilo e dois grupos de ácido propiônico. A protoporfirina IX, presente na natureza, forma complexos com diversos íons (nomeadamente o ferro, o zinco, o níquel, o cobalto ou o magnésio) que se ligam aos quatro hidrogénios livres do anéis pirrólicos. A possibilidade de esta molécula se ligar aos íons magnésio, necessários à actuação da DNA polimerase, faz com que estes compostos sejam fortes inibidores da PCR. Mesmo recorrendo à purificação do DNA os derivados da porfirinas podem também ficar retidos nas membranas de purificação (Pardo *et al.*, 1999).

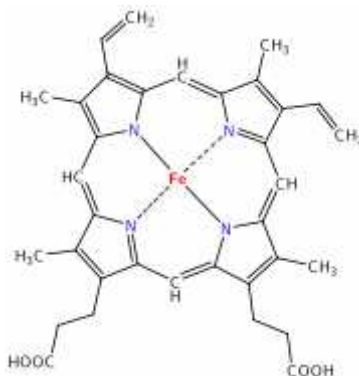


Figura 18 - Estrutura química da porfirina (Disponível em www.wikipedia.com, 2008-11-05)

Reacção de Maillard

Os produtos resultantes da reacção de *Maillard* podem conter numerosos grupos reactivos, nomeadamente os grupos hidroxilo, carbonilo e metilo que podem reagir com o DNA. A reacção de *Maillard* consiste numa reacção de um grupo carbonilo com um grupo metilo da qual resultam vários intermediários, como os compostos carbonílicos. Assim, a pH suficientemente ácido, pode dar-se a rotura das ligações fosfodiester e N-glicosídicas do DNA, com consequente libertação das pentoses para o meio, servindo de substrato para a reacção de *Maillard* (Hänni, 1995).

Componentes dos métodos de extracção

Algumas substâncias utilizadas na extracção do DNA podem, também, tornar-se fortes inibidores da PCR. O SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) e a protease K são detergentes cuja principal função é a destruição de proteínas celulares. Desta forma, se o tempo e a temperatura de actuação destes detergentes não forem controlados, podem danificar a estrutura da *Taq Polimerase* e por conseguinte inibir a PCR. Assim, estes detergentes devem ser eliminados ou inactivados antes da amplificação do material genético (Pardo *et al.*, 1999).

4.3.2. Outras metodologias

De um modo geral, as metodologias empregues para a quantificação do DNA extraído são baseadas em diluições do material extraído que pode ser evidenciado através de géis de agarose com brometo de etídio, por espectrofotometria ou utilizando um sistema *slot blot* por quimioluminescência (Swango, 2006).

Electroforese

A quantificação de DNA por **electroforese em gel de agarose** é a técnica de menor precisão quando comparada com outras, porém de grande valia pela sua simplicidade, sendo um ágil instrumento para demonstração de êxito na etapa de extracção (Swango, 2006). O procedimento experimental decorre dos seguintes passos essenciais (Videira, 2001):

- Preparar o gel: dissolver a agarose numa solução tampão.
 - i) Suspende a agarose no tampão e ferver até obter uma mistura homogénea. Deixar arrefecer até 50 °C antes de deitar a mistura líquida dentro do molde, contendo um pente de modo a formar câmaras para a aplicação da solução de DNA (Figura 19 A). Deixar solidificar o gel durante, aproximadamente, 30 minutos. Retirar o pente.
- Colocar o gel num tanque de electroforese, imerso em tampão, entre dois eléctrodos paralelos à fileira de poços do gel.
- Aplicar em cada uma das câmaras presentes no gel, as amostras de DNA onde se adicionou previamente uma solução de corante com elevada densidade (Figura 19 B). Como referência aplicar também uma amostra contendo uma mistura de fragmentos de DNA de peso molecular conhecido. As amostras do DNA são colocadas nos poços do gel e migram do pólo negativo para o pólo positivo, uma vez que os ácidos nucleicos têm uma carga negativa em pH neutro.
- Iniciar a electroforese por aplicação do campo eléctrico (Figura 19 C). Os ácidos nucleicos migram pelo gel segundo o seu peso molecular. Assim, as moléculas maiores migram mais lentamente que as de reduzido tamanho, formando bandas ao longo do gel. Estas bandas podem ser visualizadas através de luz UV quando se utiliza brometo de etídio na preparação do gel. Este composto intercala com as moléculas de DNA e que, após exposição aos raios UV, emite uma fluorescência alaranjada (Figura 19 D). A análise dos fragmentos migrados pode ser feita pela comparação com fragmentos já

conhecidos, uma vez que existe uma relação quase linear entre o logaritmo do peso molecular do DNA e a distância percorrida no gel.

NOTA: O corante pode ser adicionado à amostra se se submergir o gel num banho de brometo de etódio.

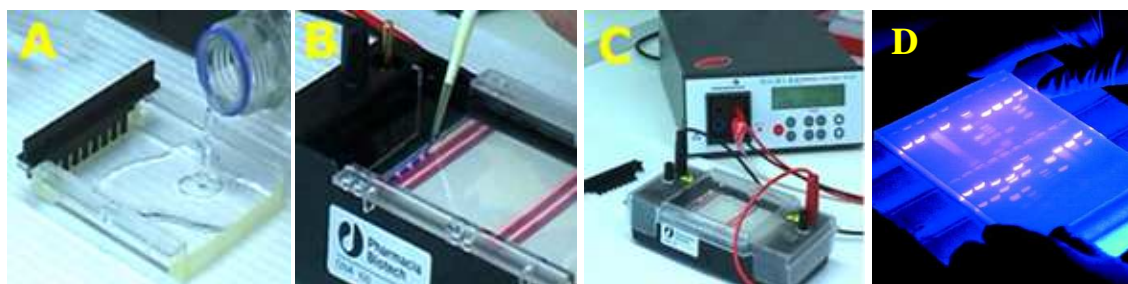


Figura 19 – Procedimento geral de uma electroforese: (A) colocação da agarose na câmara; (B) Pipetagem da solução corante de alta densidade; (C) Início da electroforese por aplicação do campo magnético. (Disponível em: <http://www.e-escola.pt/>, 2008-11-07) (D) Visualização do gel através de raios UV (Disponível em www.biologyreference.com/, 2008-11-05).

Slot Blot

Através do sistema **slot blot por quimioluminescência** (Figura 20) é possível proceder-se à quantificação do DNA por hibridização com a sonda D17Z1, específica para primatas superiores e com isto verificar se o DNA extraído é humano. Trata-se de uma metodologia morosa e que requer um trabalho intensivo. No entanto, segundo Swango (2006), a quantificação *slot blot* tem demonstrado algumas desvantagens, nomeadamente as seguintes:

- subestima a quantidade de DNA nuclear em amostras degradadas e em amostras que contêm níveis elevados de contaminação microbiana;
- não fornece nenhuma informação sobre a qualidade (comprimento dos fragmentos) do DNA nuclear quantificado;
- não fornece nenhuma informação prévia sobre a existência de inibidores que possam interferir com a PCR.



Figura 20 - Sistema Slot Blot (Disponível em: <http://midsci.com/>, 2008-11-04).

Espectrofotometria

O método **espectrofotométrico** de quantificação de DNA é geralmente utilizado para determinar a concentração e a pureza dos ácidos nucleicos numa solução. Um exemplo amplamente utilizado, principalmente na análise de amostras LCN é o espectrofotómetro de densidade óptica **NanoDrop** (Figura 21) (*ND-1000 UV/Vis*) (Swango, 2006). O espectrofotómetro *NanoDrop UV/Vis* permite analisar 1 µl de amostra com alta precisão e notável reprodutibilidade. A utilização destes sistemas elimina a necessidade de tinas e capilares, diminuindo o tempo do ciclo de medição. Além disso, a elevada capacidade de absorção elimina a necessidade de diluições⁵.

Figura 21 – *NanoDrop* (Disponível em www.nanodrop.com, 2008-11-05).



⁵ Disponível em www.nanodrop.com, 2008-11-07.

Schiffner *et al.* (2005) referem outros métodos de quantificação de amostras de DNA LCN, nomeadamente o método ***Quantiblot slot blot*** (*Applied Biosystems*), o ***Rotogene 3000*** (*Corbett Research*) e o **ALU** baseado num ensaio de **PCR em tempo real** (RT-PCR).

A utilização de *kits* comerciais é hoje em dia uma prática comum, principalmente devido à eficiência desta metodologia. Alguns desses *kits* são utilizados na prática laboratorial de análise forense de amostras degradadas, nomeadamente o ***Quantifiler® Human DNA Quantification Kit*** (*Applied Biosystems*) (Tabela 1).

Tabela 1 - *Quantifiler® Human DNA Quantification Kit* (*Applied Biosystems*)

Kit comercial	Características
<i>Quantifiler® Human DNA Quantification</i>	<p>Kit de quantificação de DNA com base na RT-PCR utilizado na identificação humana.</p> <p>Quantifica a quantidade amplificável do DNA humano que está presente numa amostra.</p> <p>Utiliza uma PCR de controlo interno para identificar amostras que possam conter inibidores de PCR.</p> <p>Quantifica DNA de várias origens, incluindo saliva, sangue, sêmen.</p> <p>Química compatível com tecnologias de extracção comuns para uma fácil integração em protocolos laboratoriais actuais.</p>

4.5. Amplificação e análise do DNA extraído

Até há poucos anos, a análise de amostras onde era impossível recuperar grandes quantidades de DNA baseava-se na análise do DNA mitocondrial (mtDNA). No entanto, a análise deste DNA é muito laboriosa e proporciona resultados poucos informativos. É, portanto, vantajoso obter-se informação do DNA nuclear uma vez que é muito mais individualizante (Pinheiro, 2008).

Assim, pela primeira vez em 1999, no *Forensic Science Service*⁶, no Reino Unido, foi relatada a aplicação da análise de LCN no âmbito forense como alternativa ao mtDNA, sendo importante reter que o objectivo da análise de amostras LCN é obter informação nuclear (Lagoa e Pinheiro, 2008).

4.5.1. Artefactos na análise de DNA

Ao longo de todo o processo que envolve a análise do DNA vão surgindo questões práticas, tanto ao nível do exame do local do crime, como ao nível dos processos de extracção do DNA. No entanto, a principal contrariedade na análise de amostras LCN aparece na interpretação dos resultados. A este nível podem surgir alguns artefactos (Gill *et al.*, 2000 e Whitaker *et al.*, 2001), nomeadamente o aumento do tamanho dos produtos *stutter*, o desequilíbrio heterozigótico, o *allele dropout*, o *locus dropout* e o *allele dropin*:

- Os **produtos *stutter*** (Figura 22) são picos que resultam de cópias incompletas de alelos. Quando, por exemplo, são analisados sistemas tetraméricos surgem alelos com menos 4 pb que o alelo homólogo. Em condições LCN, normalmente apresentam tamanhos superiores aos que normalmente poderiam surgir (5 – 15 % do tamanho do alelo correspondente) e são designados de *falsos alelos*. Existem, ainda, situações em que não se consegue distinguir um *stutter* de um verdadeiro alelo.

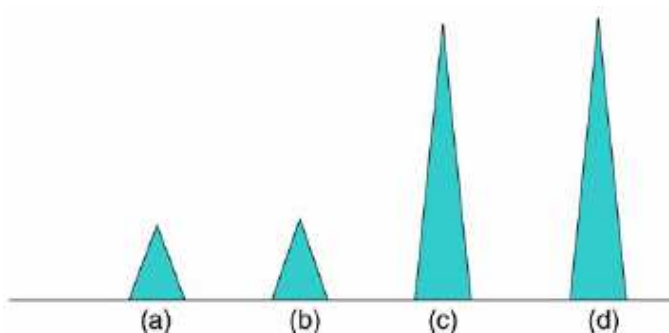


Figura 22 -Dois alelos pequenos (a) e (b), com dois alelos grandes (c) e (d), onde o alelo (b) representa um produto *stutter* (Disponível em Gill *et al.*, 2006).

⁶ Disponível em www.forensic.gov.uk.

- O **desequilíbrio heterozigótico** resulta da amplificação de um alelo em detrimento de outro. Este desequilíbrio pode surgir a diferentes níveis, nomeadamente na pipetagem da amostra ou na reacção de PCR. Se, por acaso ocorrer a pipetagem de apenas um dos alelos de um *locus*, o outro fica sub-representado. A nível da PCR se, por acaso, um alelo for amplificado nos primeiros ciclos da PCR, este será amplificado, preferencialmente, em todos os ciclos seguintes. Como consequência, esse alelo terá uma dimensão muito maior do que a do outro alelo do mesmo *locus*. A proposta apresentada por Walsh *et al.* (1992) é importante quando se analisam amostra vestigiais. Estes autores ajustaram o número de ciclos da PCR, para que a sensibilidade do método fosse de, aproximadamente, 20 células (≈ 125 pg de DNA). No entanto, quando se aumenta o número de ciclos da PCR, este limite deixa de existir. Este facto é importante tendo em consideração o fenómeno da flutuação ou variação estocástica, que normalmente ocorre em amostras vestigiais durante os primeiros ciclos da PCR. Gill *et al.* (1998) concluíram que a interpretação de misturas recorrendo à área dos picos é dificultada pelos desequilíbrios nos genótipos heterozigóticos e pelo aumento da dimensão dos produtos *stutter*.
- O **allele dropout** ocorre quando desaparece um dos alelos de um *locus* e normalmente resulta de um desequilíbrio heterozigótico muito acentuado ou de uma flutuação estocástica. Este fenómeno pode levar a que se considere a amostra como homozigótica para aquele *locus*, quando na realidade é heterozigótica.
- O **locus dropout** caracteriza-se por nenhum dos alelos do *locus* ser detectado. Está normalmente associado à degradação do material genético, verificado em *loci* com fragmentos de amplificação elevados, e a variações estocásticas.
- No **allele dropin** surgem alelos extra que geralmente resultam de contaminações esporádicas, detectadas pelo facto de o método ser muito sensível. Não é reprodutível e apenas pode ser detectado analisando uma mesma amostra várias vezes. Taberlet *et al.* (1996) estabeleceram uma taxa de 5 %, como sendo a probabilidade de se obter um alelo extra. Assim, a probabilidade de se obter o mesmo alelo em duas análises independentes é inferior a 1 %.

Gill *et al.* (2000) e Whitaker *et al.* (2001) sugeriram um conjunto de regras que facilitam a interpretação dos perfis LCN:

- Efectuar amplificações múltiplas da mesma amostra. Destas amplificações, apenas se consideram como verdadeiros (pertences à amostra) os alelos presentes em, pelo menos, duas amplificações. A este processo dá-se o nome de “método consenso” ou “regra da duplicação” (Taberlet *et al.*, 1996). Gill *et al.* (2000) demonstraram que, utilizando o cálculo de *likelihood ratio* (LR), se trata de um método conservativo e que tem em conta o aparecimento de contaminações esporádicas, formação de produtos *stutter* e de *allele dropout*;
- Realizar controlos negativos e relacioná-los com um conjunto de amostras. Se estes controlos revelarem os mesmos alelos em, pelo menos, dois desses controlos, então esses alelos, se presentes nas amostras, não devem ser considerados. Este tipo de amostras devem ser reanalisadas sempre possível;
- Consideram outras metodologias sempre que se identifique algum alelo que não pertença ao perfil do suspeito.

Capítulo 5

Polimorfismos do DNA

Polimorfismos do DNA

A individualidade genética pode ser determinada por inúmeras características hereditárias humanas, facto de grande relevância no que respeita à genética forense (Pinheiro, 2008).

Os marcadores usados em genética forense encontram-se nas **regiões não codificantes** do genoma. Para além dos STR, são actualmente utilizados outros marcadores genéticos, como os SNPs, os miniSTRs e o DNAmT. Todos estes marcadores genéticos têm sido descritos como de relevante interesse na análise de amostras de DNA degradado (Turrina *et al.*, 2008).

5.1. STR

Calcula-se que o genoma humano contenha, aproximadamente 500.000 STR ocupando cerca de 3 % de todo o genoma. O tamanho da unidade de repetição dos STR é variável, no entanto os mais usados na área da Genética Forense são os tri, tetra e pentanucleotídicos (Figura 23). Cerca de 6.000 a 10.000 são tri ou tetraméricos sendo os segundos os mais utilizados na identificação humana por possuírem alelos com tamanhos próximos, possibilitando a sua análise por PCR *multiplex*, reduzindo a amplificação preferencial de alelos de reduzido tamanho (Ng *et al.*, 2007 e Narkuti *et al.*, 2007).

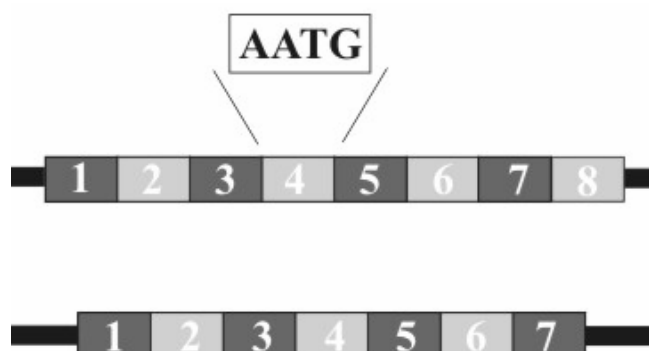


Figura 23 - *Short Tandem Repeat* tetramérico (Adaptado de <http://www.paternityexperts.com/img/str.jpg>, 2008-11-26).

Os alelos são representados segundo a nomenclatura universalmente adoptada. Estes encontram-se definidos por Algarismos que indicam o número de unidades de repetição completas. Quando surgem alelos representados por dois Algarismos separados por um ponto decimal, o Algarismo imediatamente à direita do ponto decimal representa o número de nucleótidos presentes da unidade de repetição incompleta (por exemplo: o alelo 8.4, de um determinado polimorfismo tetramérico, indica que a unidade de repetição está presente 8 vezes, mas que existem mais de 4 nucleótidos dessa unidade de repetição) (Pinheiro, 2008).

A capacidade dos STRs gerarem produtos de PCR de pequeno tamanho é benéfica nomeadamente na análise de DNA de amostras degradadas. Em termos analíticos, esta análise permite diminuir a existência de produtos *stutter* que dificultam a interpretação de resultados, nomeadamente no que respeita a misturas (Ng *et al.*, 2007 e Narkuti *et al.*, 2007).

Os STRs apresentam inúmeras vantagens, nomeadamente o facto de exigirem pequena quantidade de DNA (0,1 – 1 ng), de proporcionarem resultados com DNA degradado, de utilizarem métodos de caracterização susceptíveis de automatização, tornando possível a sua caracterização em conjunto (PCR *multiplex*), de serem altamente discriminativos entre indivíduos não relacionados e de se obterem perfis genéticos a partir da amplificação simultânea de vários *loci*, com fácil interpretação e comparação (Butler *et al.*, 2008).

A possibilidade de vários STR poderem ser analisados em conjunto proporciona o aumento do poder de discriminação, a diminuição do tempo de análise e das quantidades de DNA e de reagentes a usar. As características genéticas são claramente identificáveis, uma vez que é possível a distinção de alelos que diferem apenas em um nucleótido. O perfil genético ou genótipo de uma amostra refere-se a toda a informação genética relativa aos genótipos de todos os *loci* analisados. No entanto, na ciência forense pode não ser possível a análise de todos os *loci*, principalmente devido a inibidores, obtendo-se apenas um perfil parcial. Existe um grande número de *loci* que apresentam um elevado grau de polimorfismo genético, cuja base molecular consiste (Butler, 2005):

- i) na variação do tamanho da unidade de repetição;
- ii) no número de unidades de repetição;
- iii) nas próprias características da unidade de repetição.

O grupo de peritos da Interpol determinou um conjunto de sete *loci* STR: VWA, TH01, D21S11, FGA, D8S1179, D3S1358, D18S51 e Amelogenina imprescindíveis à identificação individual. No entanto alguns países da União Europeia, nomeadamente a Alemanha, a Holanda e a Inglaterra, além dos *loci* adoptados pela Interpol, referem também importante a identificação de mais três *loci*: D2S1338, D19S433, D16S539. Por sua vez, os Estados Unidos da América (CODIS) além dos sete *loci* adoptados pela Interpol, utiliza ainda seis novos *loci* STR: D16S539, D5S818, D7S820, D13S317, CSF1PO e TPOX (Figura 24) (Schuller *et al.*, 2001).

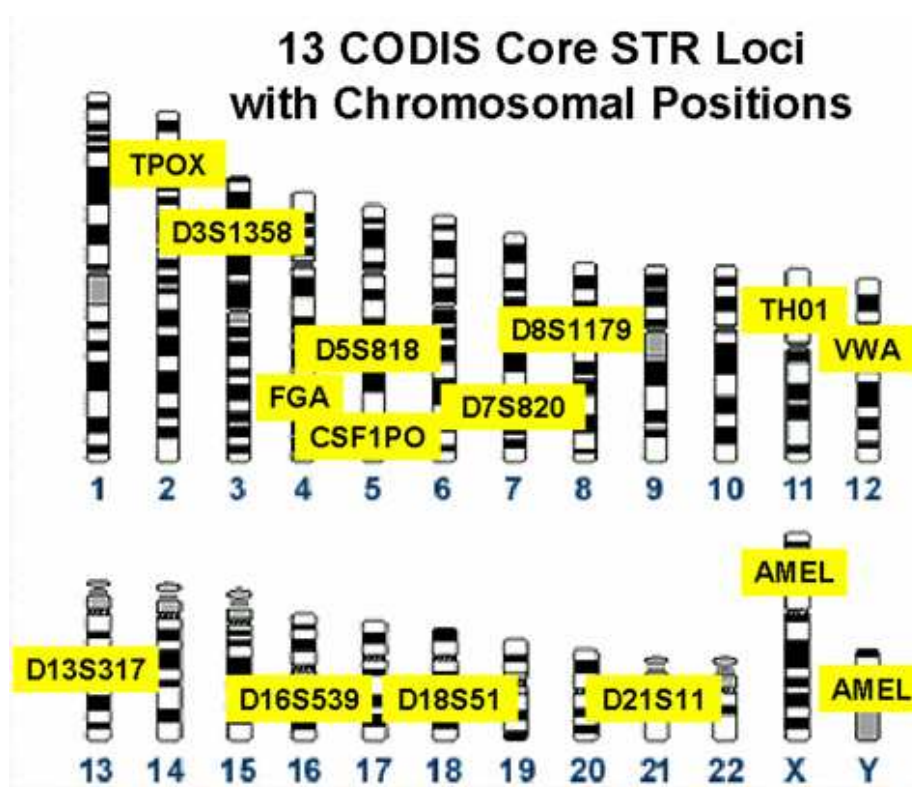


Figura 24 – 13 *Loci* STR do programa CODIS e sua posição cromossomal (Adaptado de <http://www.cstl.nist.gov/>, 2008-11-16).

Normalmente, a análise de STRs nos laboratórios forenses é feita recorrendo a *kits*, no entanto é de referir que todas as características da unidade de repetição são previamente conhecidas, bem como o número de vezes que essa unidade se repete relativamente a cada cromossoma, uma vez que existem estudos previamente efectuados que fornecem esse tipo de informações (Pinheiro, 2008).

Os *kits* vulgarmente utilizados na análise destes polimorfismos para identificação humana têm um elevado poder de discriminação, habitualmente superior a 0,9 % e valores

de heterozigotidade superiores a 70 %. Porém, existem alguns critérios de selecção importante, nomeadamente (Carracedo e Laréu, 1998):

- i) a localização em cromossomas distintos, de forma a assegurar a herança independente dos alelos;
- ii) a robustez e reprodutibilidade dos resultados;
- iii) a baixa taxa de mutação;
- iv) a formação mínima de artefactos quando caracterizados por electroforese capilar;
- v) o tamanho dos alelos (normalmente entre os 90 – 500 pb) sendo os de menor tamanho os mais apropriados para análise de amostras degradadas.

Os STRs podem encontrar-se nos autossomas ou nos cromossomas sexuais. Quando localizados nos autossomas recebem o nome de **STRs autossómicos**, enquanto que se a localização for nos cromossomas sexuais, designam-se de **STRs do cromossoma X** (cromossoma X) e **STRs do cromossoma Y** (cromossoma Y).

5.1.1. STRs autossómicos

O estudo dos STR autossómicos realiza-se sempre que é necessário resolver perícias que envolvam uma identificação individual. Recorre-se, apenas, à análise de outros polimorfismos do DNA quando se pretende obter informação adicional ou quando o material genético se encontra degradado e não é possível a obtenção de resultados pela análise deste tipo de polimorfismos.

Existem vários *kits* comerciais para análise de STRs autossómicos, sendo os mais utilizados em genética forense os *Powerplex[®] 16* (*Promega*) e o *AmpF[®] Identifier[™]* (*Applied Biosystems*) que possibilitam efectuar o estudo simultâneo de 15 marcadores genéticos e do gene homólogo da Amelogenina (determinação do género ao qual pertença a amostra biológica) (Schuller *et al.*, 2001 e Andrade *et al.*, 2008). Sempre que possível, devem utilizar-se pelo menos dois *kits* comerciais a fim de tornar os resultados mais fiáveis (Pinheiro, 2008).

Os *kits Powerplex[®] 16* e o *AmpF[®] Identifier[™]* proporcionam um elevado poder de discriminação, sendo a probabilidade de dois indivíduos, não relacionados, partilharem perfis genéticos idênticos, inferior a 10 – 15 % (Carracedo e Sánchez-Diz, 2005). Estudos

realizados por diferentes autores demonstram a aplicação destes *kits* a amostras forenses em fracas condições de conservação, obtendo resultados amplamente significativos (Tabela 2 e 3) (Schiffner *et al.*, 2005; Marjanovic *et al.*, 2007 e Turrina *et al.*, 2008).

Tabela 2- Kits comerciais de amplificação de STRs autossômicos da Applied Biosystems

Nome comercial	Características	Loci amplificados
<i>AmpFℓSTR® SEfiler Plus™</i>	Utiliza um sistema padrão de PCR de elevada <i>performance</i> e condições PCR re-otimizadas para melhorar a taxa de sucesso da “primeira passagem” com amostras “problema”. Amplifica alelos com um tamanho: 100 – 360pb. Utiliza um volume de amostra de 25µl.	D2S1338; D3S1358; D8S1179; D16S539; D18S51; D19S433; D21S11; FGA; SE33 (ACTBP2); TH01; VWA; Amelogenina.
<i>AmpFℓSTR® Profiler Plus®</i>	Utilizado em testes de paternidade. Combina as vantagens dos testes baseados na PCR e a detecção por fluorescência na identificação humana.	D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D18S51, D21S11, FGA e VWA; Amelogenina.
<i>AmpFℓSTR® COfiler</i>	Utiliza duas amplificações de PCR. Complementa o <i>AmpFℓSTR® Profiler Plus</i> . Ambos são utilizados em laboratórios de identificação humana.	CSF1P0; D16S539; TH01; TP0X; D21S11; FGA; VWA; D3S1358; D8S1179; D18S51; D16S539; TPOX; CSF1P0; D13S317; D7S820; D5S818; D19S433; D2S1338; Amelogenina.
<i>AmpFℓSTR® Profiler Plus® ID</i>	Utiliza os mesmos <i>primers</i> que o <i>kit Profiler Plus</i> e inclui um <i>primer</i> não marcado para o locus D8S1179.	D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D18S51, D21S11, FGA e VWA, D8S1179.
<i>AmpFℓSTR® Identifiler®</i>	É o kit mais discriminatório e amplamente utilizado baseado em STR para identificação humana. Utiliza um volume de amostra de 25 µl. Amplifica alelos com um tamanho de 100-360pb.	D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1P0, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenina, D5S818, FGA
<i>AmpFℓSTR® Profiler®</i>	Utilizado na identificação humana e em testes de paternidade. Combina as vantagens dos testes baseados na PCR e na detecção por fluorescência.	CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D13S317, FGA, TH01, TP0X e VWA, Amelogenina.
<i>AmpFℓSTR® SGM Plus®</i>	<i>Kit</i> altamente informativo para identificação humana, com uma probabilidade média de identificação de 1 em 5x10 ¹² .	D21S11; FGA; VWA; TH01; D3S1358; D8S1179; D18S51; D16S539; D19S433; D2S1338; Amelogenina.

Tabela 3 - Kits comerciais de amplificação de STR da Promega

Nome comercial	Características	Loci amplificados
<i>GenePrint® STR Systems (Silver Stain Detection)</i>	Método rápido e não radioactivo para avaliar pequenas quantidades de DNA humano. Fornece todos os materiais necessários para amplificar regiões STR de DNA genómico purificado (excepto para a Taq DNA polimerase). Os fragmentos STR amplificados são separados através de electroforese em gel de poliacrilamida e detectados através de uma coloração de prata. Cada <i>multiplex</i> permite amplificações simultâneas de <i>loci</i> STR não sobrepostos com elevado poder de discriminação.	Amelogenina; CSF1PO; D16S539; D7S820; D13S317; F13A01; F13B; FESFPS; HPRTB; LPL; TH01; TPOX e VWA
<i>GenePrint® Fluorescent STR Systems</i>	Utiliza um sistema <i>multiplex</i> maracado com fluoresceína (emissão de luz inferior aos 532 nm). Detectado por fluorescência com analisadores automáticos (p. e.: ABI PRISM® 310). Suporta a amplificação simultânea de 4 <i>loci</i> STR num mesmo tubo com gamas de tamanhos não sobrepostos.	Amelogenina; CSF1PO; D16S539; D7S820; D13S317; D5S818; F13A01; F13B; FESFPS; HPRTB; LPL; TH01; TPOX; VWA
<i>PowerPlex® S5 System</i>	Amplifica 5 <i>loci</i> simultaneamente, num único tubo e é analisado numa injeção única. Todos os <i>loci</i> têm um tamanho inferior a 260 pb. Gera perfis de DNA completos com pouco mais de 50 pg de DNA. É mais tolerante à análise de DNA degradado e menos sensível aos inibidores (tolerância máxima de 130 µM de hematina, 200 ng de ácido tânico ou 150 ng de ácido húmico). Analisa alelos grandes que podem desaparecer com os <i>kits megaplex</i> . Utilizado na identificação de pessoas isoladas em áreas geográficas limitadas e em catástrofes de larga escala.	D8S1179; D18S51; Amelogenina; FGA; TH01
<i>PowerPlex® 1.2 System</i>	Permite a co-amplificação e detecção de 9 <i>loci</i> . Todos os <i>loci</i> são amplificados simultaneamente num único tubo e analisados num gel ou numa injeção capilar. A análise é feita pela comparação de fragmentos de amostras de DNA com as escalas alélicas para cada <i>locus</i> .	Amelogenina; D16S539; D7S820; D13S317; D5S818; CSF1PO; TPOX; TH01; VWA
<i>PowerPlex® 1.1 System</i>	A análise é feita através da comparação de fragmentos de amostras de DNA com as escalas alélicas presentes em cada <i>locus</i> .	Amelogenina; D16S539; D7S820; D13S317; D5S818; CSF1PO; TPOX
<i>PowerPlex® 16 System</i>	É um sistema STR <i>multiplex</i> utilizado em testes de paternidade, na análises de DNA forense e em testes de identificação humana. Analisa quantidades mínimas de DNA.	Penta E; D18S51; D21S11; TH01; D3S1358; FGA; TPOX; D8S1179; vWA; Penta D; CSF1PO; D16S539; D7S820; D13S317; D5S818 Amelogenina.

5.1.2. STRs do cromossoma Y

O cromossoma Y (Figura 25) apresenta características únicas importantes na análise forense do DNA. Trata-se de um cromossoma estruturalmente pequeno, com parte do braço longo (q) formado por heterocromatina. A maior parte do cromossoma Y não recombina, à exceção de duas pequenas regiões distais pseudoautossômicas. As sequências PAR1 e PAR2 podem recombinar com os fragmentos do cromossoma X homólogos (Pinheiro, 2008).

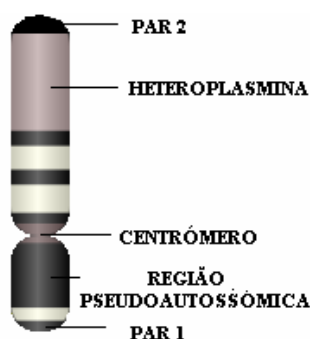


Figura 25 - Cromossoma Y (Disponível em www.wikipedia.org, 2008-11-05).

A informação genética do cromossoma Y vai sendo transmitida, de forma imutável, de pai para filho, com exceção das mutações gradualmente acumuladas (Gill *et al.*, 2001 e Jobim *et al.*, 2008).

Os STRs do cromossoma Y estão apenas presentes em indivíduos do sexo masculino como alelos únicos, segregados como haplótipos intimamente ligados na linhagem masculina de uma família (herança haplóide unilateral paterna) (Butler *et al.*, 2003). Normalmente estes marcadores usam-se em caso de parentesco biológico por via paterna, na identificação genética individual e, sobretudo em restos cadavéricos e nas agressões sexuais (Asamura *et al.*, 2007).

Existem dois kits amplamente utilizados na análise de Y-STR, o kit *AmpF ℓ STR[®] Yfiler[™]* (Applied Biosystems) e o *PowerPlex[®] Y System* (Promega) cujas características e loci amplificados se encontram descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Kits comerciais utilizados na amplificação de STRs do cromossoma Y (*AmpFℓSTR® Yfiler™* – *Applied Biosystems* e *PowerPlex® Y System* - *Promega*)

Nome comercial	Características	Loci amplificados
<i>AmpFℓSTR® Yfiler™</i>	Utilizado na análise de misturas de DNA masculino e feminino que apresentam ambiguidade ou resultados inconclusivos na análise de STRs autossômicos. Amplifica 17 <i>loci</i> numa única reacção de PCR. Utiliza um volume de reacção de 25 µL.	DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385 a/b*, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, Y GATA H4, DYS437, DYS438, DYS448 *DYS385 a/b é um <i>locus</i> duplicado no cromossoma Y e corresponde a 2 <i>loci</i> quando descrito
<i>PowerPlex® Y System</i>	Permite a amplificação simultânea de 12 <i>loci</i> analisados numa única injeção ou gel de electroforese. Amplifica apenas DNA masculino, importante na análise de misturas. O produto amplificado é menor que 335 pb o que aumenta a probabilidade de obter um perfil completo de amostras degradadas.	DYS391; DYS389I/II; DYS439; DYS393; DYS390; DYS385a/b; DYS438; DYS437; DYS19; DYS392

Asamura *et al.* (2007) apresentam os resultados de um estudo relativo à análise de amostras degradadas recorrendo a um sistema *multiplex* miniY-STR concebido pelos autores. Os conjuntos de *primers* desenhados pelos investigadores abrangem 7 *loci* Y-STR (DYS504, DYS508, DYS522, DYS540, DYS556, DYS570 e DYS576), que não pertencem ao *kit multiplex* Y-STR disponível comercialmente (*AmpfℓSTR Y-filer kit* – *Applied Biosystems*). Estes novos *primers* foram concebidos para amplificar 27 amostras com menos de 150 pb, as quais foram também amplificadas pelo *kit* comercial *AmpfℓSTR Y-filer*. O resultado do estudo demonstrou que o novo sistema *multiplex* Y-STR é muito útil na prática forense, nomeadamente na análise de amostras com DNA degradado, apresentando amplificações mais eficazes que as conseguidas pelo *kit* comercialmente disponível. Desta forma, os autores concluíram que o novo *kit multiplex* aliado aos *kits* comerciais disponíveis são mecanismos altamente eficazes para a prática forense, nomeadamente na análise de amostras de DNA degradado.

5.1.3. STR do cromossoma X

O cromossoma X (Figura 26) apresenta também *locus* de microssatélites. A mulher apresenta em cada *loci* dois alelos do DNA do cromossoma X (XX), enquanto que o homem apresenta, apenas um, o outro é o cromossoma Y (XY) (Jobim *et al.*, 2008). Estes marcadores são menos usados, tendo apenas interesse em casos de filiação que envolvam familiares que partilhem este cromossoma (Pinheiro, 2008).

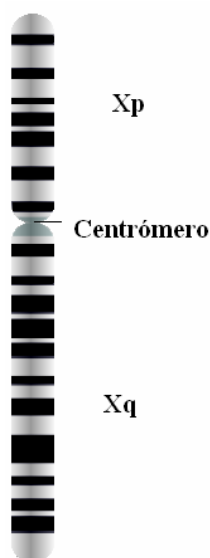


Figura 26 - Cromossoma X (Disponível em www.wikipedia.pt, 2008-11-05).

Muitos laboratórios forenses têm vindo a introduzir a análise de marcadores X-STRs na rotina laboratorial por ser uma metodologia vantajosa quando a análise do parentesco é complexa. Assim, e numa perspectiva de tentar avaliar a concordância de resultados entre laboratórios, o Grupo Espanhol e Português da Sociedade Internacional de Genética Forense (GEP-ISFG) realizou um exercício com o objectivo de avaliar os perfis obtidos a partir de uma análise *decaplex* X-STR, que incluíam os 10 seguintes *loci*: DXS8378, DXS9898, DXS7133, GATA31E08, GATA172D05, DXS7423, DXS6809, DXS7132, DXS9902 e DXS6789 (Figura 27). Para este estudo foram enviados aos participantes 2 amostras de manchas de sangue em papel e uma alíquota de *primers* para amplificação dos 10 STRs incluídos no *multiplex*. Os componentes e condições de PCR utilizadas encontram-se disponíveis no site: <http://www.gep-isfg.org/ISFG> (Gusmão *et al.*, 2008).

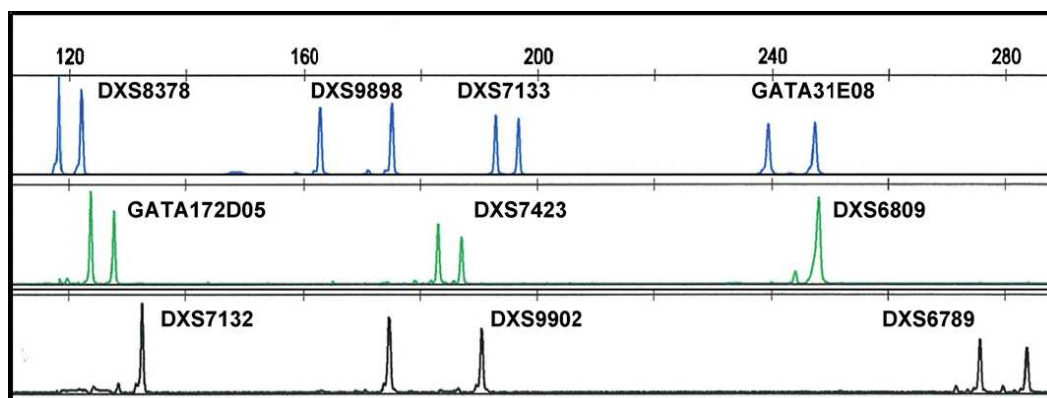


Figura 27 - Electroferograma do perfil feminino para o *Decaplex X-STR* (Adaptado de Gusmão *et al.*, 2008).

As conclusões a que chegou o GEP-ISFG foram bastante positivas. O recém-construído *decaplex* provou ser tecnicamente muito robusto uma vez que a maioria dos laboratórios obteve bons resultados com as amostras distribuídas. Desta forma, o GEP-ISFG tenciona confrontar resultados de várias populações, nomeadamente a ibérica e a sul-americana e determinar se este ensaio *decaplex* poderá ser um método padrão de amplificação de X-STRs (Gusmão *et al.*, 2008).

5.1.4. MiniSTRs

Os miniSTRs não são mais do que STRs com fragmentos de amplificação de menor tamanho, aproximadamente, 150 pb, que, tal como os STRs, também podem ser utilizados em condições LCN (com um mínimo de detecção de 5 pg de DNA) aumentando o número de ciclos da PCR (Gill *et al.*, 2000; Butler *et al.*, 2003; Coble e Butler, 2005 e Grubwieser *et al.*, 2006). No entanto, o grande e fundamental problema associado à análise de STRs é o facto de estes marcadores utilizarem ensaios *multiplex* dos quais resultam produtos de PCR com uma grande variedade de tamanhos. Desta forma, com o objectivo de diminuir o tamanho dos *amplicons* produzidos, tem vindo a recorrer-se cada vez mais à análise de miniSTRs. Estes polimorfismos podem ser analisados utilizando kits comerciais ou não comerciais.

A análise dos miniSTRs pode ser feita recorrendo a ensaios *miniplex*, sendo, por isso, necessária a utilização de *primers* que se liguem a zonas mais próximas da região de repetição (Figura 28) (Butler *et al.*, 2003 e Coble e Butler, 2005).

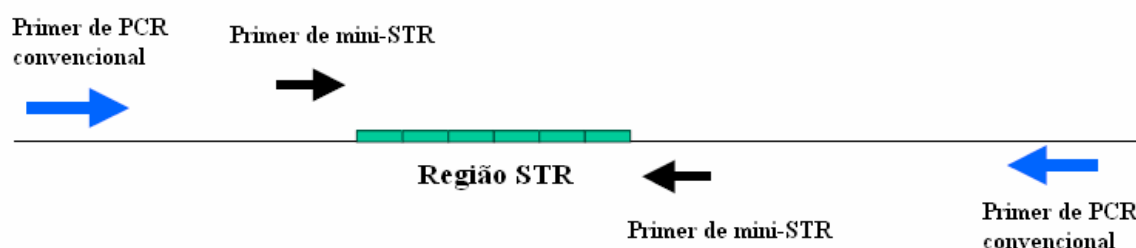


Figura 28 - Representação esquemática de *primers* miniSTR (Disponível em <http://www.cstl.nist.gov/>, 2008-11-05).

Os primeiros miniSTRs surgiram quando o *Forensic Science Service*, em 1994, recorreu à análise de amostras de DNA a partir de restos cadavéricos com DNA degradado provenientes das vítimas do incêndio no *Branch Davidian*, em Waco, no Texas. Os investigadores concluíram que, se se amplificassem STRs de menor tamanho se obtinham melhores resultados. Anos mais tarde, em 2001, os miniSTRs foram utilizados pelo Laboratório *Bode* (EUA) na identificação das vítimas do *World Trade Center* (Butler *et al.*, 2003). Ainda no mesmo ano, Butler e McCord desenvolveram um ensaio com cinco *miniplex* que incluía todos os *loci* STR definidos pelo programa CODIS, mas também os *loci* STR D2S1338, Penta D e Penta E. Os primeiros estudos foram realizados com o intuito de desenvolver *primers* específicos e escalas alélicas que pudessem ajudar a otimizar a sensibilidade do método. Este estudo estava limitado a 3 *loci* exigindo múltiplas amplificações PCR para se obterem os mesmos números de *locus* dos conseguidos com os ensaios comerciais *megaplex* STRs. Desta forma, os autores optaram por realizar várias combinações em função do corante (*dye label*) utilizado. Os autores publicaram combinações de 3 *loci* originando 5 *miniplex* com um *loci* por cada *dye label*, como a referenciado na Tabela 5.

Tabela 5 - Miniplex desenvolvidos por Butler *et al.* (2003). O "Big Mini" é uma combinação dos miniplexes 1 e 3 e permite a análise de 6 STRs que não se sobrepõem em termos de tamanho

		FAM (Azul)	VIC (Verde)	NED (Amarelo)
"Big Mini"	miniplex 1	TH01	CSF1PO	TPOX
	miniplex 3	FGA	D21S11	D7S820
	miniplex 2	D5S818	D8S1179	D16S539
	miniplex 4	VWA	D18S51	D13S317
	miniplex 5	PentaD	PentaE	D2S1338

O kit comercial *Powerplex[®] 16* da *Promega Corporation* foi o kit escolhido para comparação de resultados com os *miniplex 2* e o "Big-mini" quando se analisaram amostras com algum grau de degradação. As amostras resultaram de manchas de sangue envelhecidas e armazenadas à temperatura ambiente sem qualquer tipo de tratamento. O DNA foi extraído recorrendo à utilização de *Chelex*. A amplificação por PCR utilizou um volume de 25 µL de amostra e foi realizada nas seguintes condições (Butler *et al.*, 2003):

- Incubação inicial de 10 minutos a 95 °C;
- Amplificação de **28 ciclos**: 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto e 72 °C durante 1 minuto;
- Incubação a 60 °C durante 45 minutos;
- Armazenamento das amostras à temperatura ambiente (25 °C).

O aumento do número de ciclos da PCR ou a adição de uma maior quantidade de DNA polimerase podem aumentar a quantidade de DNA, no entanto é importante conhecer as implicações e problemas de interpretação que daí podem surgir (Butler *et al.*, 2003). A análise dos resultados deste estudo permite concluir que, por exemplo, os *loci* de maior tamanho presentes no kit *PowerPlex[®] 16*, como o *CSF1PO* e o *Penta D* apresentam um sinal muito reduzido em comparação com o *miniplex* utilizado (Figura 29) (Butler *et al.*, 2003).

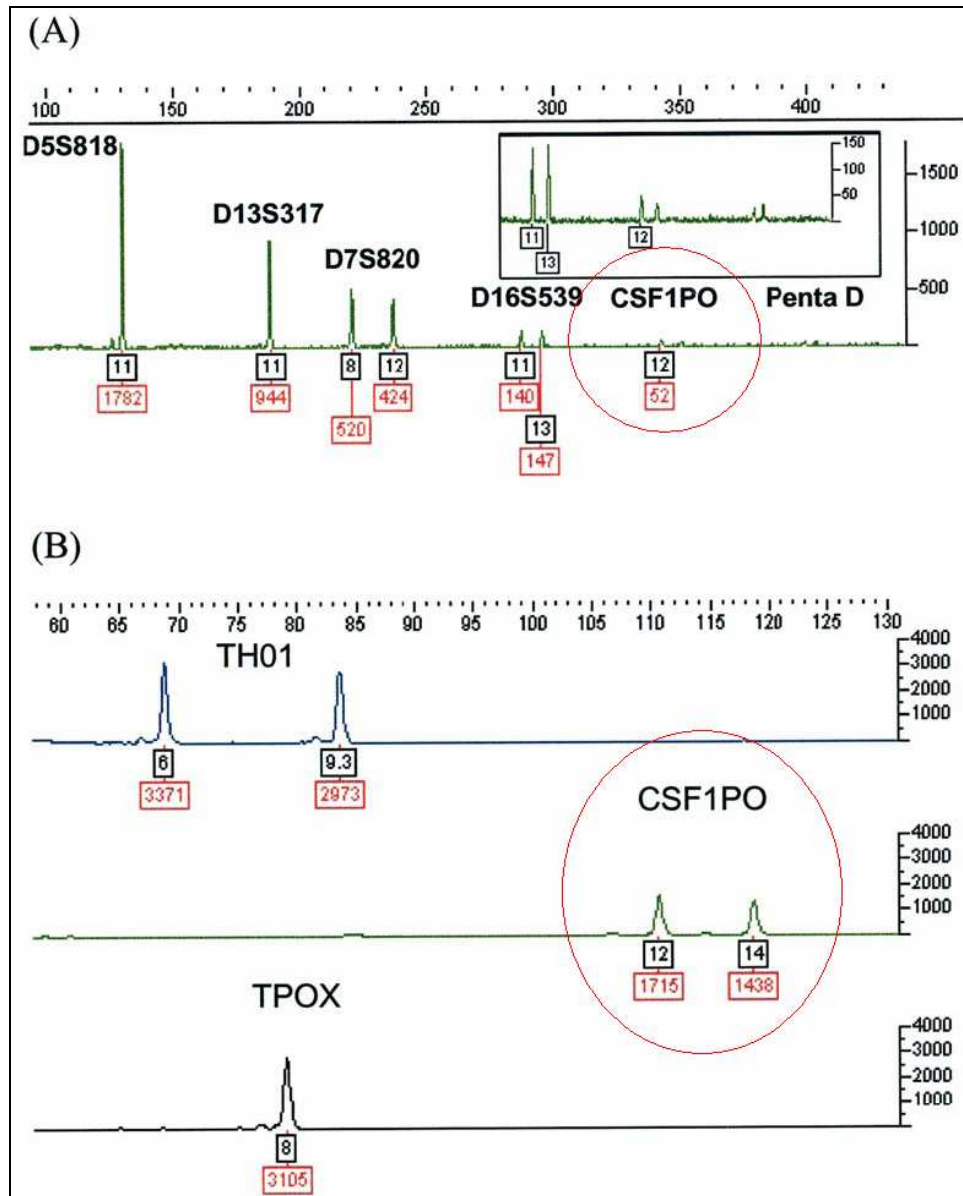


Figura 29 - Comparação das alturas dos alelos STR obtidas a partir do *kit* comercial *PowerPlex*® 16 (A) e do *miniplex* 1 (B) com quantidades equivalentes da mesma amostra de manchas de sangue envelhecido (Adaptado de Butler *et al.*, 2003).

Os investigadores puderam concluir que, de uma forma geral, os miniSTRs são uma nova e potencial ferramenta para a recuperação de informações úteis a partir de amostras “problema” que com os *kits* comerciais não eram conseguidas e de onde, apenas, se podiam gerar perfis parciais (Butler *et al.*, 2003).

Segundo o cronograma apresentado na *Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase*⁷, Butler e Gill em 2004 em colaboração com o EDNAP (*European DNA Profiling Group*) e o ENFSI (*European Network of Forensic Science Institutes*) realizaram estudos onde desenvolviam testes com STRs convencionais, ensaios com miniSTRs e SNPs aplicados à análise de amostras degradadas. Em 2005, Coble e Butler publicaram os resultados da análise de um número elevado de *loci* miniSTRs da qual surgiu uma sequência de *primers* para caracterização de 6 marcadores genéticos. O objectivo principal deste trabalho era criar conjuntos de *multiplex*, designados de *miniplex*, normalmente com um único *locus* em cada *dye color*. Os investigadores utilizaram STRs que tivessem alta heterozigosidade, alelos de pequeno tamanho e de onde se pudessem obter *amplicons* curtos para aplicar *primers* o mais próximo possível da região a amplificar. A selecção da sequência de *primers* a amplificar foi feita para os *loci* seleccionados neste estudo foi a presente na *Genome DataBase* (<http://www.gdb.org>) e os *primers* foram desenhados segundo a regra de complementaridade de bases e marcados com corantes fluorescentes (Tabela 6).

Tabela 6 - Sequência de *primers* miniSTRs presentes neste estudo. O NED, FAM E VIC (*Applied Biosystems*) referem-se marcadores fluorescentes utilizados (Adaptado de Coble e Bulter, 2005).

Marker Name	Primer Sequence (5'-3')
D1S1677	for [NED]-TTCTGTTGGTATAGAGCAGTGTTT rev <u>G</u> TGACAGGAAGGACGGAATG
D2S441	for [VIC]-CTGTGGCTCATCTATGAAAATT rev <u>G</u> AAGTGGCTGTGGTGTATGAT
D4S2364	for [FAM]-CTAGGAGATCATGTGGGTATGATT rev <u>G</u> CAGTGAATAAATGAACGAATGGA
D10S1248	for [FAM]-TTAATGAATTGAACAAATGAGTGAG rev <u>G</u> CAACTCTGGTTGTATTGTCTTCAT
D14S1434	for [VIC]-TGTAATAACTCTACGACTGTCTGTCTG rev <u>G</u> AATAGGAGGTGGATGGATGG
D22S1045	for [NED]-ATTTTCCCCGATGATAGTAGTCT rev <u>G</u> CGAATGTATGATTGGCAATATTTT

O desenho padrão de *primers* utilizado foi o seguinte: temperatura média de actuação entre os 57 °C e 63 °C (preferencialmente 60 °C), com um tamanho mínimo de 18

⁷ Disponível em <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/index.htm>, 2008-11-13.

bases nucleotídicas e com uma percentagem de C - G entre os 20 e os 80 %. O estudo foi realizado utilizando dois conjuntos de *miniplex*, o *miniplex01* e o *miniplex02* (Tabela 7) e os resultados foram comparados com o *kit* comercial *Powerplex® 16* e o estudo realizado com 16 amostras extraídas de ossos degradados.

Tabela 7 – Conjunto de loci dos *miniplex01* e *miniplex02* (Adaptado de Butler e Coble, 2005)

	<i>Miniplex01</i>	<i>Miniplex02</i>
Loci amplificados	D10S1248	D1S1677
	D14S1434	D2S441
	D22S1045	D4S2364

O volume de amostra utilizado na reacção da PCR foi de 25 µL, sendo as condições de amplificação as referidas abaixo:

- Incubação inicial a 95 °C durante 10 minutos;
- **32 ciclos** de amplificação: 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto e 72 °C durante 1 minuto;
- Incubação final de 45 minutos a 60 °C.
- Estabilizada à temperatura de 25 °C.

Das 16 amostras inicialmente testadas, apenas de uma não obtiveram resultados, em consequência da reduzida quantidade de amostra utilizada, no entanto quando se utilizou o *kit* comercial (Figura 30A), apenas se obteve um perfil completo. Todos os *loci miniplex01* (Figura 30B) e *miniplex02* (Figura 30C) foram digitados com sucesso para as 15 amostras.

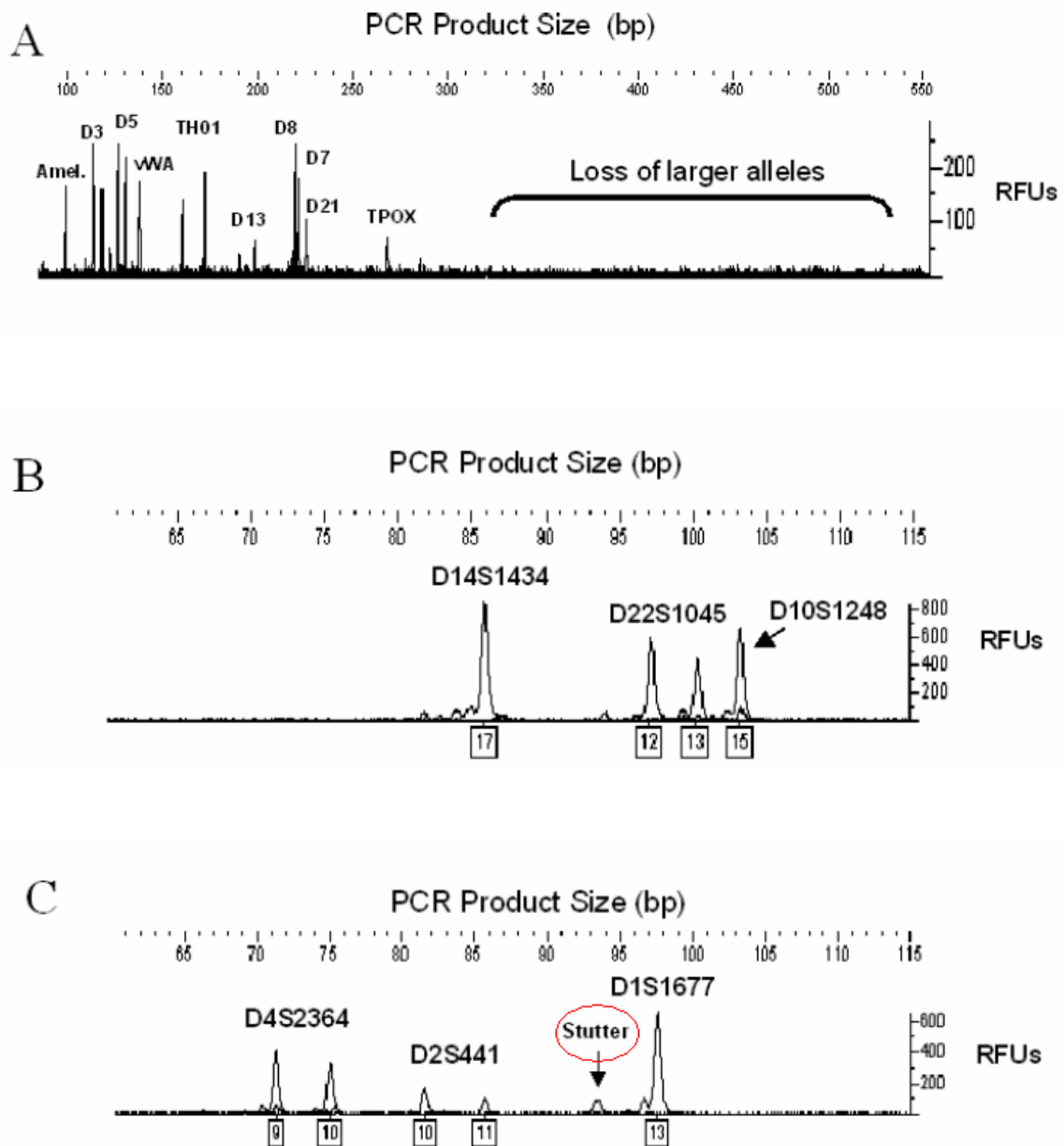


Figura 30 – Comparação do tamanho dos alelos STR obtidos a partir do *Kit PowerPlex®16* (A) e dos *loci miniplex01* (B) e *miniplex02* (C) com montantes equivalentes da mesma amostra de osso degradado. As alturas estão em unidades de fluorescência relativa (RFUs - *Relative Fluorescence Units*) (Adaptado de Butler e Coble, 2005)

O trabalho desenvolvido por Butler e Coble (2005) permitiu aumentar o poder de discriminação quando se analisam amostras de DNA altamente degradado recorrendo à utilização de 2 miniSTRs *triplex* com um alvo de amplificação de 125 pb. Os *loci* utilizados apresentaram resultados confiáveis e sensíveis, pelo menos, em amostras de DNA modelo de 100 pg sob condições controladas de laboratório e em amostras de DNA

intactas. No entanto, a digitação de amostras LCN ou de DNA degradado deve incluir uma interpretação cuidadosa dos resultados, principalmente devido ao aparecimento de artefactos, nomeadamente os *stutters* (como se verifica na Figura 30C). Ainda em 2005, os grupos ENFSI e EDNAP propuseram a adopção de bases de dados dinâmicas e que evoluam de acordo com o desenvolvimento científico desta área de forma a puderem ser incorporados novos *loci* aos sistemas miniSTR *multiplex*. Isto permitirá um incremento do poder de discriminação e da sensibilidade da análise para testar amostras com quantidades exíguas de DNA degradado. Nesta perspectiva, foi recomendada a adopção universal de 3 dos seguintes miniSTRs – D10S1248, D14S434 e D22S1045 - para além das 7 *loci* STRs (STR VWA, TH01, D21S11, FGA, D8S1179, D3S1358, D18S51) adoptados pela Interpol (Coble e Butler, 2005).

Os grupos ENFSI e EDNAP têm como objectivo dar continuidade ao processo de standardização dos marcadores genéticos usados na Europa, com a finalidade do estabelecimento de bases de dados genéticos. Em 2006, foi expressa a necessidade de adopção de outros marcadores, para além dos usados, a fim de proporcionarem resultados fiáveis quando as amostras de DNA se encontram degradadas. Desta forma, Gill, Fereday, Morling e Schneider representando os grupos EDNAP e ENFSI propuseram a adopção dos miniSTRs como o caminho a seguir para aumentar a robustez e a sensibilidade da análise forense do DNA⁸. Posteriormente, foi feita uma rectificação a esta recomendação, tendo sido sugerida a substituição do D14S1434 pelo D2S441, uma vez que este possui um maior poder informativo. No entanto, a adopção deste sistema poderia ser posta em causa por haver dois *loci* situados no mesmo cromossoma, o D2S441 e o D2S1338. Apesar, de se localizarem em diferentes braços do cromossoma estão separados por um número elevado de bases, assegurando-se a herança mendeliana dos seus alelos (Gill *et al.*, 2006).

Em 2006, Grubwieser *et al.* publicaram resultados de um ensaio com *multiplex* projectados para os seguintes *loci*: D2S1338, D16S539, D18S51, TH01, FGA e a Amelogenina usando *primers* redesenhados de forma a reduzir os tamanhos dos produtos da amplificação, em comparação com os modelos utilizados em *multiplex* de *kits* comercialmente disponíveis (Tabela 8).

⁸ Disponível em <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/miniSTR.htm>, 2008-11-03.

Tabela 8 - Locus, sequência de primers e dye colors para este ensaio miniSTR multiplex (Adaptado de Grubwieser et al., 2006).

Locus	MiniSTR primers (5'→3')	Dye
TH01mini/f	CCTGTTCCCTCCCTTATTTCCC	FAM
TH01mini/r	GGGAACACAGACTCCATGGTG	
Amelo/f	CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG	FAM
Amelo/r	ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG	
D2mini/f	CAGTGGATTTGGAAACAGAAATG	FAM
D2mini/r	TCAGTAAGTTAAAGGATTGCAGG	
D18S51mini/f	TGAGTGACAAATTGAGACCTT	TET
D18S51mini/r	GTCTTACAATAACAGTTGCTACTATT	
D16S539mini/f	ATACAGACAGACAGACAGGTG	HEX
D16S539mini/r	GCATGTATCTATCATCCATCTCT	
FGAmini/f	GGCATATTTACAAGCTAGTTTCT	HEX
FGAmini/r	ATTTGTCTGTAATTGCCAGC	

O DNA das amostras problema utilizadas neste estudo foi extraído utilizando a extracção orgânica fenol-clorofórmio num volume total de 25 a 50 µL, que corresponde, aproximadamente, a um total de 10 a 20 µL de DNA extraído. A PCR foi realizada recorrendo a **30 ciclos** de amplificação, nas seguintes condições de tempo e temperatura:

- Incubação inicial a 95 °C durante 11 minutos;
- Desnaturação das pontes de Hidrogénio por incubação a 94 °C durante 1 minuto;
- *Annealing* dos *primers* a 56 °C durante 1 minuto;
- Síntese da nova cadeia de DNA a 72 °C durante 1 minuto.
- Incubação final durante 45 minutos a 60 °C.

Os resultados destes *multiplex* miniSTRs foram comparados com os obtidos com os do *kit* comercial *SGMplus* (*Applied Biosystems*) chegando-se à conclusão que, para as amostras degradadas, este *kit* apenas consegue identificar perfis parciais e para alguns *loci* não foi sequer possível obter qualquer perfil. Em contrapartida, a amplificação recorrendo aos *multiplex* miniSTRs aumentou número global de *loci* analisados aumentando assim o poder de discriminação dos perfis STRs obtidos. Os autores concluíram por isso que os

multiplex miniSTRs são valiosas ferramentas adicionais à análise convencional de STRs (Grubwieser *et al.*, 2006).

Romano *et al.* (2006) publicaram os resultados do estudo de amostras LCN. Os autores recorreram à amplificação de miniSTRs utilizando um *kit* comercial, o *Mentype*[®] *Nonaplex*^{QS} (BioType AG) (Tabela 9). Neste ensaio foram utilizadas amostras de DNA extraídas de pontas de cigarros, características por apresentarem um baixo número de cópias. Este *kit* foi desenvolvido para amplificar *loci* STR *multiplex* pertencentes ao Banco de Dados de DNA Forense alemão e recomendados pela EDNAP. Numa reacção de PCR são amplificados em simultâneo 8 *loci* STR⁹.

Tabela 9 – Kit de amplificação *Mentype*[®] *Nonaplex*^{QS} da BioType AG (Adaptado de <http://en.biotype.de>, 2008-11-23)

Kit	Características	<i>Loci</i> amplificados
<i>Mentype</i> [®] <i>Nonaplex</i> ^{QS}	<p>Permite a genotipagem rápida e confiável de amostras de DNA de sangue, de esfregaços bucais e manchas forenses.</p> <p>Foi concebido um <i>primer</i> para cada <i>loci</i> rotulado com marcadores fluorescentes: 6-FAM (Amelogenina, D8S1179, D21S11 e D18S51), HEX (TH01, D3S1358 e SE33) ou NED (VWA e FGA).</p> <p>Contém um controlo interno da PCR (<i>Quality Sensor</i> “SQ”), que disponibiliza informação sobre a eficiência da reacção e a presença de inibidores da PCR.</p> <p>Tem um limite de detecção inferior a 200 pg de DNA genómico. É recomendada a utilização de 0,2 - 2,0 ng de DNA para 30 ciclos de amplificação, com um volume de reacção de 25 µL.</p>	<p>D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA (FIBRA), SE33 (ACTBP2), TH01 (TC11), Amelogenina</p>

Segundo o fabricante, o *kit Mentype*[®] *Nonaplex*^{QS} apresenta o número de ciclos depende da quantidade de DNA da amostra. Como método *standard* são recomendados 30 ciclos de amplificação, enquanto que para a análise de manchas de pequenas quantidades de DNA genómico são recomendados 34 ciclos de amplificação. As condições de amplificação estão descritas na Tabela 10.

⁹ Disponível em http://en.biotype.de/files/downloads/products/mentype/Manual_Mentype%20Nonaplex-QS.pdf, 2008-11-23.

Tabela 10 – Condições de amplificação do Kit comercial *Mentype® Nonaplex^{QS}* (Adaptado de <http://en.biotype.de>, 2008-11-23)

Método	Temperatura	Tempo
Standard 30 ciclos de amplificação	94 °C	4 minutos
	94 °C	30 segundos
	60 °C	120 segundos
	72 °C	75 °C
	68 °C	60 minutos
	10 °C	Tempo indeterminado
Opcional 34 ciclos de amplificação	94 °C	4 minutos
	94 °C	30 segundos
	60 °C	120 segundos
	72 °C	75 segundos
	68 °C	60 minutos
	10 °C	Tempo indeterminado

Romano et al. (2006) utilizaram o protocolo comercialmente proposto para análise de miniSTRs obtendo resultados inconclusivos. No entanto, um pequeno aumento do número de ciclos aumentou drasticamente a eficiência da amplificação, concluindo-se assim que a utilização de 32 ciclos de amplificação eram suficientes para se obter um perfil completo dos 9 *loci* miniSTRs.

Em 2007, Parsons *et al.* publicaram um estudo sobre a análise de restos ósseos degradados recuperados de valas comuns provenientes dos conflitos na ex-Jugoslávia, entre 1992 e 1999. Para o estudo do DNA extraído destes ossos, os autores recorreram a três ensaios *multiplex* de miniSTRs, um *7-plex*, um *6-plex* e um *5-plex*. Os conjuntos de *primers* e os respectivos *loci* amplificados encontram-se discriminados na Tabela 11.

Tabela 11 – *Loci* e concentrações de *primers* utilizados (Adaptado de Parsons *et al.*, 2007)

	<i>Loci</i>	<i>Dye color</i>	Concentração
7 plex (MP1)	TH01	6FAM	3 μ M
	Amelogenin	6FAM	3 μ M
	FGA	6FAM	10 μ M
	D18251	VIC	10 μ M
	Penta D	NED	35 μ M
	D2S1338	PET	10 μ M
	D21S11	PET	50 μ M
6 plex(MP2)	vWA	6FAM	7.5 μ M
	CSF1P0	VIC	5 μ M
	D13S317	NED	5 μ M
	D7S820	NED	10 μ M
	D8S1179	PET	27 μ M
	D21S11	PET	15 μ M
5 plex(MP3)	FGA	6FAM	10 μ M
	CSF1P0	VIC	5 μ M
	D21S11	VIC	20 μ M
	Penta D	NED	25 μ M
	Penta E	PET)	40 μ M

A reacção de PCR utilizou um volume de 25 μ L com ciclos com as seguintes condições:

- Incubação inicial a 95 °C durante 11 minutos; Seguida de uma nova incubação a 96 °C durante 1 minuto;
- **10 ciclos:** de 94 °C por 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 1 minutos;
- **22 ciclos:** de 90 °C durante 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto;
- Incubação final a 60 °C por 45 minutos.

Em 15 a 20 % das amostras estudadas os resultados obtidos pela utilização dos *miniplex* foram mais vantajosos e obtidos em, aproximadamente, 35 % do tempo. Desta forma, os autores concluíram também que os *miniplex* utilizados fornecem uma capacidade de recuperação de dados genéticos bastante restrita. Ainda assim, a reduzida amplificação

obtida pelos *multiplex* é claramente uma ferramenta importante na recuperação de DNA de restos ósseos, nomeadamente pelo seu baixo custo e a sua alta taxa de sucesso.

Também em 2007, a *Applied Biosystems* desenvolveu um *kit miniSTR 9 plex* projectado para recuperar informações a partir do *kit Identifiler* e completa os seguintes *loci*: D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO, FGA, e Amelogenina, que lançou para o mercado no início de 2007 com o nome comercial: *kit MiniFiler* (Tabela 12).

Alguns STRs de *kits* comerciais, como o D3S1358 e o D19S433 do *kit AmpFℓSTR® Identifiler™* (Tabela 2), podem ser considerados miniSTRs, pois o seu tamanho é comparável a estes (Butler *et al.*, 2003; Coble e Butler, 2005 e Grubwieser *et al.*, 2006).

Tabela 12 - Kits comerciais de amplificação de STR da *Applied Biosystems*

Nome comercial	Características	Loci amplificados
<i>AmpFℓSTR® MiniFiler™</i>	<p>Aumenta a capacidade de obter resultados de DNA de amostras comprometedoras com um rendimento limitado e sem dados genéticos. Uma amplificação apenas fornece informação dos 8 maiores <i>loci</i> mais difíceis de amplificar no <i>AmpFℓSTR® Identifiler®</i> e do <i>SGM Plus®</i>.</p> <p>Optimizado para utilizar com os tipos de amostras mais difíceis, incluindo aquelas que estão degradadas e que contêm inibidores.</p> <p>Capacidade de suprimir efeitos inibitórios de substâncias, como o heme e ácido húmico que se encontram, geralmente, em amostras forenses.</p> <p>Pode ser utilizado como um suplmento a outros <i>kit</i> comerciais de amplificação para recuperar grandes <i>loci</i>, que não podem ser amplificados ou que desaparecem.</p> <p>Volume da reacção: 25 µL</p> <p>Tamanhos dos alelos: 70 - 283 pb</p>	D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO, FGA e Amelogenina.

Andrade *et al.* (2008) utilizaram o *kit miniSTR* comercial para realizar um estudo de 16 amostras “problema” de sangue, saliva, ossos, dentes e pêlos. Nesta investigação, os autores utilizaram o *kit* comercial *Identifiler™* e *MiniFiler™* a fim de testar o novo *kit miniSTR*.

O DNA foi extraído a partir de esfregaços de manchas de sangue ou saliva por extracção de fenol/clorofórmio, de ossos e dentes pelo *kit Puregene DNA IsolationTM* (Gentra Systems) e dos pêlos e tecidos pelo *kit* extracção *HairTM* (Promega).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que para qualquer amostra e quantidade analisadas se obtiveram perfis quando se utilizava o *kit* comercial *MiniFilerTM*, verificando-se também que o mesmo já não acontecia quando se utilizava o *kit IdentifierTM* (Tabela 13).

Tabela 13 - Resultados obtidos com amostras analisadas utilizando o *IdentifierTM* e *MiniFilerTM* (Adaptado de Andrade *et al.*, 2008).

Samples/(quantity (ng/ μ l))	Identifier TM	MiniFiler TM	No coincident results (false homozygotes detected with Minifiler)
Hair (0.0017)	–	1 locus	–
Hair (0.0036)	–	1 locus	–
Hair (0.0054)	–	3 loci	–
Hair (0.0139)	–	4 loci	–
Hair (0.0140)	–	9 loci	–
Hair (0.0216)	–	5 loci	–
Hair (0.0332)	–	1 locus	–
Hair (0.0491)	–	8 loci	–
Bone (0.0015)	12 loci	8 loci	–
Bone (0.0247)	8 loci	9 loci	D13S317, D18S51, HUMFIBRA/FGA
Bone (0.0286)	12 loci	8 loci	D2S1338, D21S11
Bone (0.0480)	13 loci	9 loci	–
Bone (0.1600)	11 loci	9 loci	D18S51, HUMFIBRA/FGA
Tooth (0.0380)	13 loci	9 loci	CSF1PO, D18S51, HUMFIBRA/FGA
Degraded saliva (0.0380)	8 loci	8 loci	D16S539
Degraded blood (0.0660)	11 loci	9 loci	–

Os autores demonstram que o *kit MiniFilerTM* PCR cede maior quantidade de informação a partir de amostras que anteriormente produziram perfis parciais ou não produziram perfis quando utilizaram outros *kits* autossómicos de amplificação comercialmente disponíveis. Na presença de inibidores da PCR, o *MiniFilerTM* supera outros *kits* no que diz respeito à recuperação de perfis. A utilização de uma dupla estratégia de amplificação (*MiniFilerTM* e *IdentifierTM*) pode tornar-se adequada para lidar com amostras comprometida já que permite a obtenção de informações das bases de dados mais comuns de marcadores autossómicos, sem a necessidade de novos estudos populacionais. Uma importante vantagem deste novo *kit* é a possibilidade de verificar a presença de falsos homozigóticos e artefactos definidos através *IdentifierTM*, já que o *MiniFilerTM* reduz as variações estocásticas produzidas pela melhoria das condições de amplificação em amostras LCN (Andrade *et al.*, 2008).

Apesar de todas as vantagens da análise de miniSTRs, alguns autores apresentam também algumas desvantagens. Os miniSTRs apenas permitem a amplificação de um número limitado de polimorfismos em simultâneo e os produtos amplificados apresentavam tamanhos muito próximos mesmo quando os *loci* são marcados com fluorocromos distintos, sendo por isto menos discriminativos que os STRs (Grubwieser *et al.*, 2006).

5.2. DNA Mitocondrial

A sequenciação do mtDNA tem sido muito utilizada na identificação individual forense, devido às suas características intrínsecas, nomeadamente o grande número de cópias por célula, a herança materna, a alta taxa evolutiva e a não recombinação (Asari, 2007).

O genoma mitocondrial humano é considerado como um único *locus*, devido à ausência de recombinação, o que faz com que a sua análise proporcione um poder de discriminação inferior ao do nuclear. No entanto, o elevado número de cópias de mtDNA permite supor que algumas dessas cópias se encontrem em amostras onde não é possível efectuar a caracterização de polimorfismos de DNA nuclear. Por este facto, nas situações em que não se obtêm resultados do estudo de STRs autossómicos, a análise da sequência do mtDNA da região *D-loop*, conhecida por região controlo, é uma boa alternativa. Estas situações surgem quando (Brown, 2002 e Castella *et al.*, 2006):

- i) o DNA é escasso ou se encontra degradado, como em hastes de pêlos ou restos cadavéricos antigos ou deficientemente preservados;
- ii) há necessidade de efectuar comparações genéticas de familiares de linhagem materna;
- iii) quando é importante obter informação adicional.

Nos casos atrás mencionados estudam-se as duas regiões hipervariáveis (HVI e HVII) da referida região, constituída por 1.122 pb, cada uma das quais com cerca de 400 pb. A análise das duas regiões hipervariáveis é, em geral, efectuada por sequenciação cíclica directa (Brown, 2002).

O mtDNA (Figura 31) é normalmente usado quando a quantidade de DNA genómico extraído não é suficiente para a digitação de STRs, uma vez que cada célula tem um elevado número de cópias. No entanto, trata-se de uma metodologia laboriosa que nem sempre proporciona resultados. Embora a sequenciação das Regiões Hipervariáveis I e II (HVRI/HVRII) seja altamente informativa, outras regiões dentro a região controle do genoma mitocondrial podem ser analisadas, de forma a conseguir um maior poder de discriminação (Szibor *et al.*, 2007).

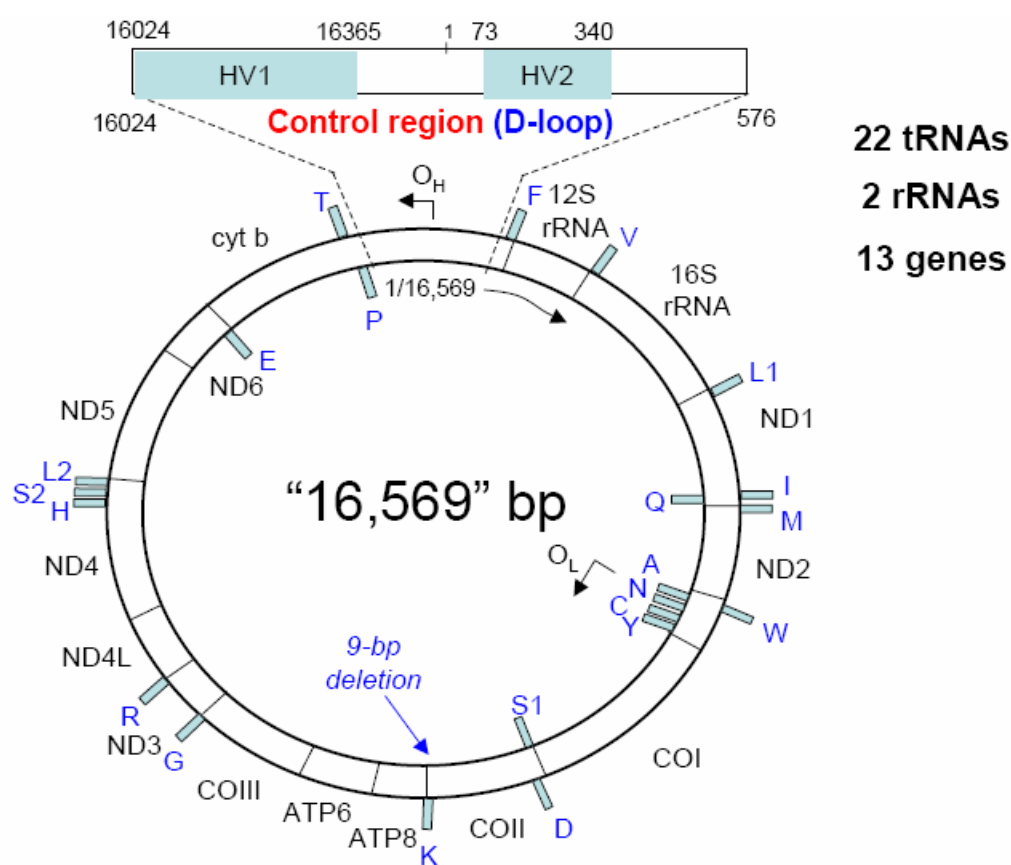


Figura 31 – DNA mitocondrial – Região D - loop (Disponível em http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/pub_pres/Coble_mtDNAworkshop_Mar2006a.pdf, 2008-11-15).

Segundo Szibor *et al.* (2007) uma das regiões mais informativas do mtDNA dentro da região controlo é a repetição de um dinucleotido (CA)_n localizado entre as posições 514 e 524, normalmente aparece com a sequência ACACACACAC ou (AC)₅, na maioria dos indivíduos e pode variar de (AC)₃ a (AC)₇. No entanto, outras inserções e deleções podem ocorrer, como a supressão de 9 pb (posições 8277 a 8285) em alguns indivíduos provenientes da Ásia e Ilhas do Pacífico (haplogroup B) e africanos (haplogroup L) (Coble,

2006a). Tipicamente, apenas são analisadas 610 bases do conjunto das duas Regiões Hipervariáveis (HVI: 16024 - 16365 e HVII: 73 - 340) (Figura 32).

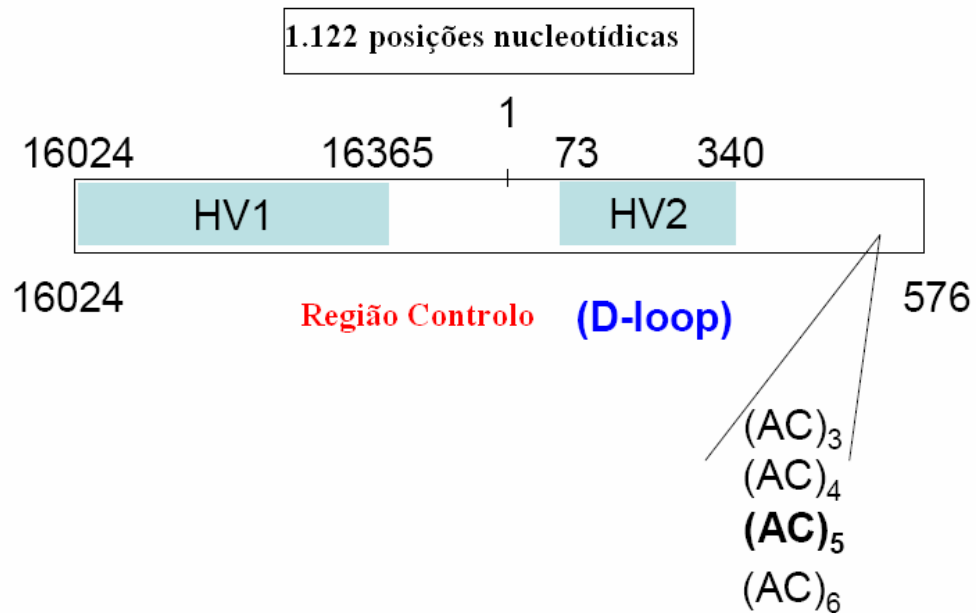


Figura 32 - Região do mtDNA de interesse forense (Adaptado de Coble, 2006a)

A quantificação do DNA por métodos utilizados antes do desenvolvimento de quantificação em tempo real, muitas vezes não era suficientemente sensível para os vestígios de DNA presentes nos tipos de materiais forenses encontradas (Szibor *et al.*, 2007).

5.3. SNP

Os SNP tornam-se marcadores de interesse para a comunidade forense devido à sua abundância no genoma humano e ao seu baixo índice de mutação, possibilitando a análise de pequenos fragmentos de DNA e a automatização da sua análises por métodos tecnológicos (Quintáns *et al.*, 2004).

É difícil estipular uma estimativa do número de SNPs no genoma humano, mas nas diferentes bases de dados, até 2005, mais de cinco milhões de SNPs foram recolhidos e

cerca de quatro milhões de SNPs foram validados. No domínio forense é importante o interesse dos SNPs uma vez que apresentam um número de características próprias que os tornam muito adequados para estudos forenses. Em primeiro lugar, estes marcadores têm taxas de mutação muito baixas, utilizam tecnologias de elevada precisão, permitem a automatização e utilizam *amplicons* de tamanho reduzido uma vez que o tamanho do produto amplificado é crítico para o sucesso da análise de amostras degradadas (Sobrinho *et al.*, 2005a).

A principal vantagem do estudo de SNPs em relação aos STRs é apresentarem menor tamanho dos produtos amplificados, em geral inferior a 100 pb, permitindo o estudo de material degradado (com por exemplo, cadáveres em avançado estado de decomposição ou carbonizados) (Gill *et al.*, 2000). No entanto, os SNPs também têm algumas limitações, em primeiro lugar o número de SNPs exigido é de cerca de quatro vezes o número de STRs (em média), uma vez que são necessários cerca de 60 SNPs para se obter um poder de discriminação semelhante ao dos *multiplex* STRs ou miniSTRs (Sobrinho *et al.*, 2005a).

Segundo Sobrinho *et al.* (2005a), os SNPs podem não substituir os STRs como principal método de escolha na análise forense, mas tornam-se importantes marcadores de eleição para a análise do cromossoma Y e dos Haplogrupos do mtDNA. No entanto, não existe um método ideal para a digitação de SNPs e a selecção da técnica mais adequada depende dos requisitos pré estabelecidos. Os métodos de genotipagem de STRs são, muitas vezes, difíceis de se manterem actualizados e de decidir quais as melhores opções disponíveis.

Em 2005 foi publicado, por Sobrinho *et al.*, um conjunto de metodologias de tipagem de SNPs que foram surgindo até essa data. No entanto, para perceber cada uma das tecnologias é importante perceber as diferenças entre reacções de discriminação alélica, formato dos ensaios e métodos de detecção. A maioria dos ensaios de genotipagem de SNPs pode ser atribuído a um dos quatro mecanismos moleculares: **hibridação alelo-específica, extensão de primers, ligação de oligonucleótidos e clivagem invasiva.**

Existem duas categorias diferentes relacionadas com o formato dos ensaios: reacções homogéneas, quando elas ocorrem em soluções e reacções em suporte sólido, como a lâmina de vidro, um *chip* ou uma pérola. Em geral, as reacções homogéneas são mais propícias a automatização porque não há passos de separação ou purificação após a reacção de discriminação do alelo. No entanto, o grande inconveniente é a limitada

capacidade *multiplex*. Em contrapartida, as reacções em suportes sólidos têm maior capacidade *multiplex*, ainda que com algumas manipulações (Sobrinho *et al.*, 2005a).

Hibridização alelo-específica

A hibridização alelo específica, também conhecida como hibridação oligonucleótido alelo-específica (ASO) (Figura 33), é baseada na distinção entre dois alvos diferentes de DNA numa posição nucleotídica através de uma reacção de hibridização. Geralmente são concebidas duas sondas alelo-específicas, definindo a base polimórfica numa posição central da sequência da sonda. Sob condições optimizadas, apenas os híbridos específicos perfeitamente emparelhados às sondas são estáveis, enquanto os híbridos com um desfasamento de base são instáveis. As sondas ASO com *dot-blot* reverso foram utilizadas para detectar os primeiros polimorfismos analisados por PCR no campo forense, no entanto já foram amplamente substituídos pela análise dos STRs. Para tirar pleno partido das novas sonda ASO formadas para digitação de SNPs é necessário utilizar métodos de detecção que forneçam alta precisão e alta sensibilidade.

Hibridização alelo-específica

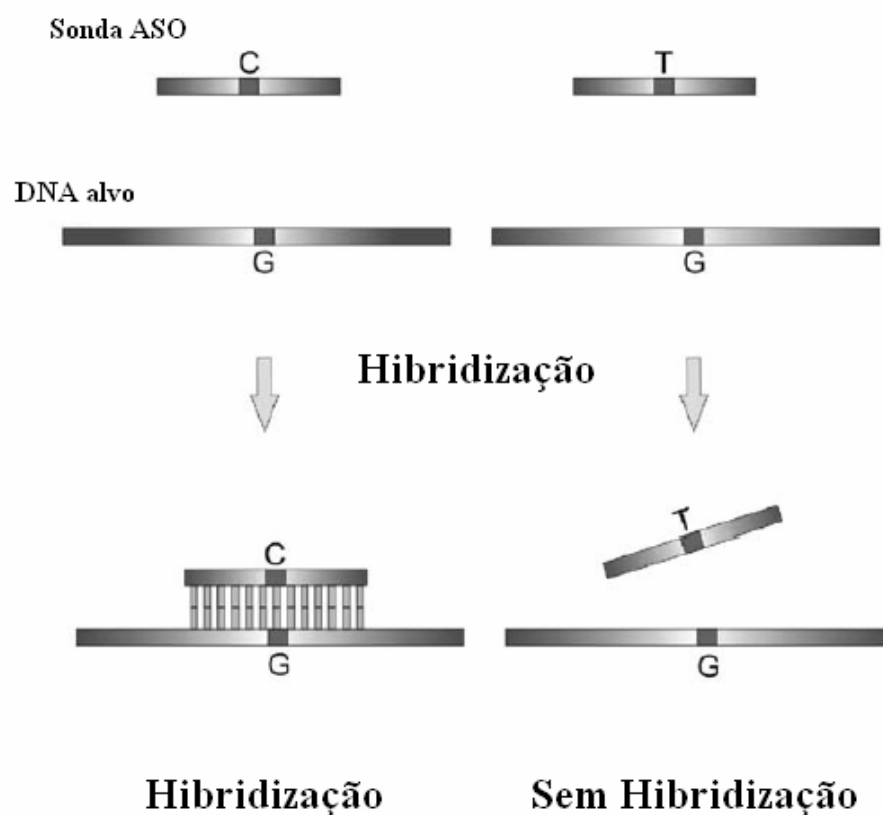


Figura 33 – Hibridização com oligonucleótidos alelo específicos (Adaptado de Sobrino *et al.*, 2005a).

Extensão de Primers

A extensão dos *primers* é baseada na habilidade de incorporar desoxirribonucleótidos complementares à DNA polimerase específicos para a sequência do DNA alvo. Existem diversas variantes de reacções de extensão de *primers* que podem ser divididos em dois tipos principais de reacção: a reacção de minisequenciação ou extensão de *primers* de um único nucleótido em que a base do polimorfismo é determinado pela adição dos ddNTPs complementares às bases do DNA e a extensão alelo-específica na qual a DNA polimerase amplifica apenas se os *primers* tiverem uma correspondência perfeita com o DNA molde. Uma outra abordagem alternativa para o sequenciação do DNA é pirosequenciação, que também é baseada na reacção da DNA polimerase (Figura 34).

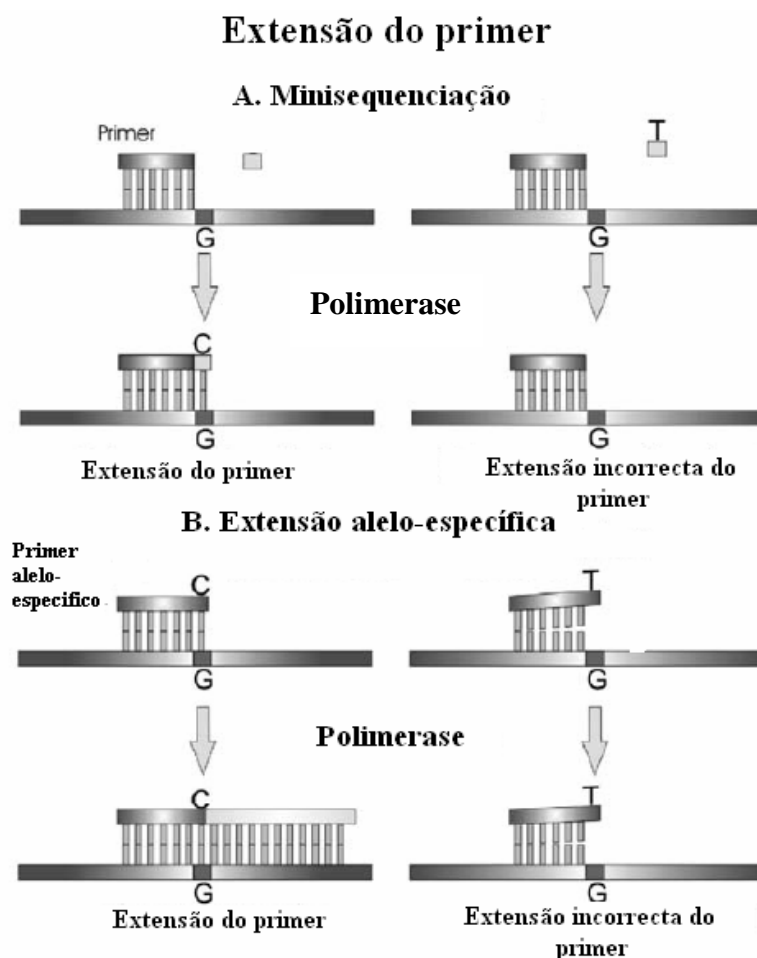


Figura 34 – Reacções que envolvem a Extensão de *primers*: Minisequenciação (A) e Extensão alelo específicos (B) (Adaptado de Sobrino *et al.*, 2005a).

Ligação oligonucleotídica alelo-específica

O ensaio de ligação de oligonucleótidos (OLA - *oligonucleotide ligation assay*) (Figura 35) como método de tipagem SNPs é baseado na capacidade de unir covalentemente, através de ligases, dois oligonucleótidos quando estes hibridizam uns a seguir aos outros sobre o molde de DNA. O ensaio OLA requer três sondas concebidas em comum e dois alelos específicos em que os *primers* hibridizam a jusante do SNP em estudo; uma sonda alélica tem na terminação 3' os nucleótidos complementares a um alelo e outra sonda alélica complementar ao alelo alternativo. Apenas as sondas alélicas perfeitamente ligadas ao DNA alvo podem ser ligadas, pela ligase, à sonda comum.

O uso de DNA ligases termostáveis permite repetidos ciclos térmicos, resultando num aumento linear dos produtos ligados.

As tecnologias mais recentes de genotipagem pelo método de ligação de oligonucleótidos alelo-específicos são o *SNPlexTM* (*Applied Biosystems*) e o sistema de genotipagem *Illumina* (*Illumina Inc.*), metodologias baseadas em ligases específicas.

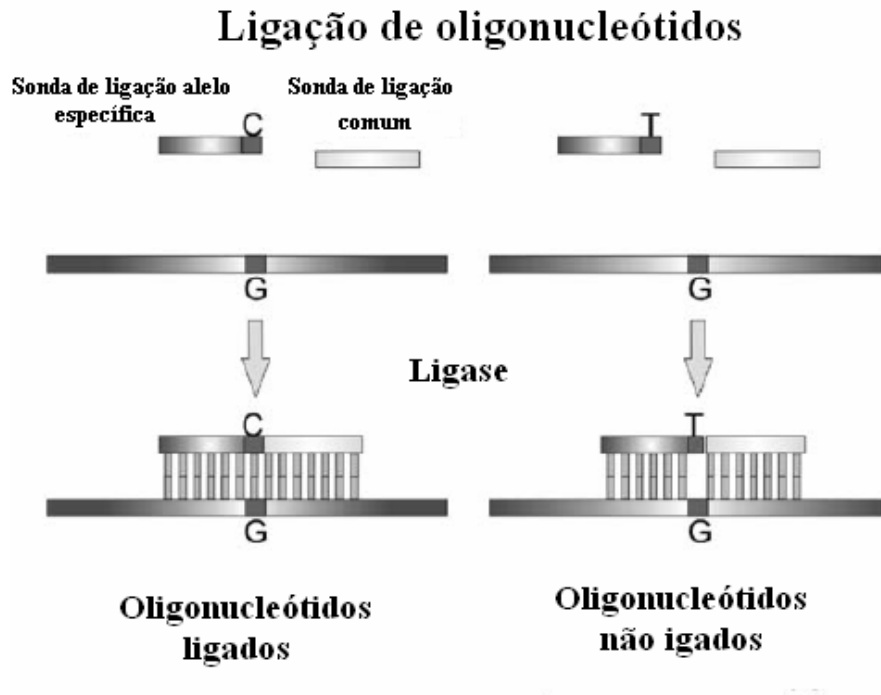


Figura 35 - Ensaio de ligação de oligonucleótidos (OLA): dois ensaios alelo específicos e uma sonda de ligação comum necessários à ligação ao SNP (Adaptado de Sobrino et al., 2005a).

Clivagem invasiva

O ensaio *Invader[®]* (*Third WaveTM Technology*) é baseado na especificidade do reconhecimento e na clivagem, por uma endonuclease *Flap*, da estrutura tridimensional formada quando dois oligonucleótidos hidridizam perfeitamente ao DNA alvo (Figura 36).

Os dois oligonucleótidos requerem, um “nucleótido invasor” e uma sonda ligada ao DNA alvo com uma sobreposição de um nucleótido. O oligonucleótido invasor é complementar à sequência 3’ do SNP. A sonda foi concebida por complementaridade de bases e contém duas regiões, uma complementar a um dos alelos do SNP sobre o terminal 5’ do polimorfismo e não complementar à região 5’. Quando a base alélica é complementar à base do polimorfismo em estudo a sonda sobrepõe-se à terminação 3’ do oligonucleótido formando uma estrutura que é reconhecida e clivada pela endonuclease *Flap*, libertando a

terminação 5'. A sequência é depois submetida a elevadas temperaturas, permitindo uma rápida desnaturação da sonda após a clivagem, impedindo que a endonuclease produza múltiplas clivagens na molécula de DNA alvo. Desta forma, a genotipagem pelo *Invader* é um método que não utiliza a PCR mas que necessesceita uma grande quantidade de DNA alvo, o que a torna inviável para amostras de DNA degradado ou com baixo número de cópias. Uma forma de aumentar a sensibilidade deste método é a realização de uma reacção de PCR antes da análise pelo *Invader*, conhecida como *PCR-Invader*.

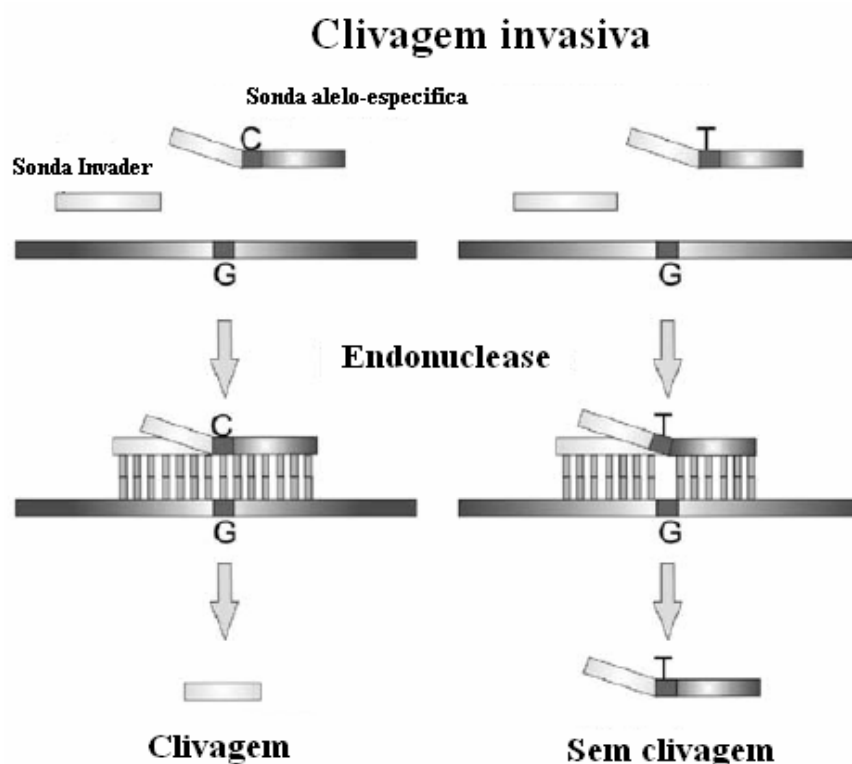


Figura 36 – Clivagem Invasiva clivagem: oligonucleótidos que exigem sondas *Invader* e alelo que se ligam ao DNA alvo com sobreposição de um nucleótido (Adaptado de Sobrino *et al.*, 2005a).

Quintáns *et al.* (2004) descreveram o método de tipagem *SNaPshot*, uma das metodologias de minisequênciação que possibilitam o estudo simultâneo de um elevado número de SNP.

SNaPshot

A reacção *Snapshot* é uma reacção baseada na extensão de uma base única de dideoxi (ddNTP), um oligonucleótido não marcado no terminal 3', imediatamente adjacente ao SNP em estudo (na ausência de dNTPs na reacção) (Figura 37). Cada ddNTP é marcado com diferentes corantes fluorescentes e uma quinta cor é utilizada para rotular o marcador interno (LIZ120). A extensão dos *primers* do *Snapshot* é determinada pelos diferentes tamanhos e cores dos SNPs (Quintáns *et al.*, 2004).

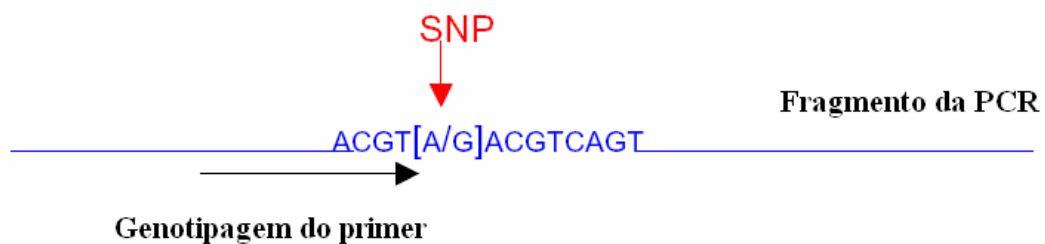


Figura 37 - Princípio da técnica *Snapshot* (Adaptado de <http://www.genetics.med.ed.ac.uk/protocols/SNaPshot.pdf>, 2008-11-05).

A *Applied Biosystems*¹⁰ define um protocolo de utilização do método *Snapshot* envolvido na genotipagem de SNPs que utiliza apenas ensaios *multiplex*. A mistura da reacção contém a enzima (*Sequenase type*), o tampão e os 4 ddNTPs marcados com diferentes cores:

- Adenina - verde;
- Citosina - preto;
- Guanina - azul;
- Timina - vermelho;

Durante a reacção são incorporados os diferentes ddNTPs marcados com os diferentes fluorocromos e, no final, os genótipos são lidos mediante os picos de cores obtidos (Figura 38).

¹⁰ Disponível em: <http://www.genetics.med.ed.ac.uk/protocols/SNaPshot.pdf>, 2008-11-04.

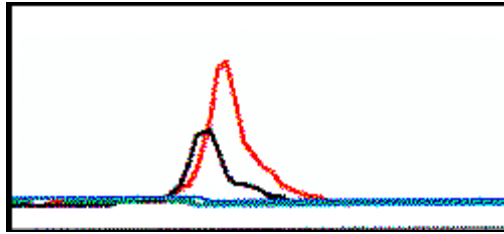


Figura 38 - Visualização dos resultados obtidos com a marcação com os diferentes ddNTPs (Adaptado de <http://www.genetics.med.ed.ac.uk/protocols/SNaPshot.pdf>, 2008-11-05).

O ensaio é desenhado tendo em conta a sequência que se quer determinar, assim os *primers* devem ser desenhados de forma a parar apenas no terminal 5' do SNP. Para tal, deve ter-se em conta a necessidade de definir um terminal 3' auto-*priming* para evitar que durante o processo de extensão, o *primer* se amplifique a si próprio e um dímero 3' para impedir a amplificação do *primer* complementar.

O tamanho dos *primers* pode variar de 15 a 30 nucleotídeos, no entanto, se se utilizar um ensaio *multiplex* devem definir-se diferentes *primers* para os diferentes nucleótidos. Os *multiplex* são definidos mediante o tamanho dos *primers* ou segundo as cores dos fluorocromos associados aos nucleótidos.

As reacções de extensão com diferentes *primers* têm diferentes graus de eficiência, tornando-se num potencial problema para as reacções *multiplex* em Tempo Real. No entanto, o problema pode ser facilmente contornado ajustando-se a concentração *primers*, uma vez que o resultado do *Snapshot* é uma reacção linear em que a altura dos picos está directamente relacionada com a extensão dos *primers*. Na tabela abaixo (Tabela14) encontram-se definidas algumas das características gerais e respectivas aplicações do *Snapshot*.

Tabela 14 – Características gerais e aplicações do *SNaPshot® Multiplex System* (Adaptado de www.appliedbiosystems.com, 2008-11-04)

<i>SNaPshot® Multiplex System</i>	
Características gerais	Método baseado na extensão de <i>primers</i> que possibilita a análise de 10 SNP numa reacção <i>multiplex</i> .
Aplicações	Pesquisa e confirmação de SNP
	Avaliação da metilação do DNA
	BACs <i>fingerprints</i>
	Pesquisa e susceptibilidade das amostras

Sanchez e Endicott (2006) descreveram um protocolo de genotipagem de SNPs aplicados à análise de DNA antigo e altamente degradado, usando uma reacção *multiplex* de duas fases. Numa primeira fase os múltiplos fragmentos da PCR foram amplificados numa reacção exponencial, servindo como bases lineares numa segunda fase. Este método utiliza um sistema de electroforese capilar para todo o tipo alvo, protocolo que veio facilitar a análise de até 52 marcadores SNPs (haplóides ou diplóide), permitindo a análise de 96 amostras num único dia, sendo recomendada para a autenticação dos dados em todas as áreas da investigação de DNA, nomeadamente a genética populacional, a genética médica e forense (análise de antigo DNA). Em contrapartida, é necessário utilizar, cerca de 45 a 50 *loci* para se obter um poder de discriminação comparável ao dos *multiplex* STRs (Sanchez e Endicott, 2006).

Ainda em 2006, Bender *et al.* publicaram um estudo de digitação de SNPs recorrendo à Pirosequenciação, no entanto, em paralelo, foi usado a técnica de minisequenciação *Snapshot* como método de referência.

Pirosequenciação

A Pirosequenciação é uma tecnologia de sequenciação de SNPs baseada na detecção luminescente de pirofosfato liberada mediante a incorporação dos nucleótidos pela DNA polimerase. A reacção gera um *flash* de luz que é detectado e mostrado como um pico no pirograma e a altura de cada pico é proporcional ao número de nucleótidos incorporados (Bender *et al.*, 2006). Esta tecnologia utiliza um sistema de enzimas em cascata, quatro enzimas e substratos específicos, para produzir luz quando um nucleótido é complementar ao DNA molde. O sinal luminoso é detectado e a base registada, sendo os próximos nucleótidos adicionados. Se o nucleótido adicionado não for complementar à base seguinte, não será gerada luz. A Pirosequenciação proporciona uma rápida determinação em tempo real de, cerca de 20 - 30 bp do DNA alvo (Sobrinho *et al.*, 2005).

Segundo o estudo realizado por Bender *et al.* (2006) a reacção *multiplex* de Pirosequenciação permite a análise simultânea de múltiplas amostras de DNA. As reacções de PCR únicas e *multiplex* foram realizadas para amplificar cada um dos 23 SNPs seleccionados pelo Consórcio *SNPfor^{ID}*.

A reacção de PCR utilizou um volume de 100 µL de mistura de reacção e utilizou 40 ciclos de amplificação nas seguintes condições:

- Desnaturação inicial a 95 °C durante 10 minutos;
- Desnaturação a 95 °C durante 10 segundos;
- *Annealling* dos *primers* a 60 °C durante 30 segundos;
- Extensão a 65 °C durante 30 segundos;
- Extensão final a 65 °C durante 6 minutos.

Os *primers* utilizados foram desenhados para amplificar fragmentos curtos de 59 a 117 pb.

Numa primeira etapa os 23 SNPs foram amplificados por PCR e analisados pela Pirosequenciação, no entanto, apenas 22 foram analisados com sucesso (SNP 10,2). Todos os resultados foram controlados por minisequencing. Estes resultados demonstram claramente que a digitação de 23 SNPs fora de uma reacção de PCR *23-plex* parece ser possível sob condições optimizadas.

Capítulo 6

Considerações finais

Considerações finais

Nas investigações forenses onde a população suspeita é limitada ou muito próxima, a resolução do problema pode restringir-se à análise de marcadores genéticos de baixo poder discriminatório. Porém, sempre que uma investigação científica envolve um maior número de suspeitos, envolvendo uma população não limitada, recorre-se à análise do material biológico através de métodos de maior poder discriminatório.

As técnicas actualmente utilizadas têm vindo a permitir uma análise rápida e eficiente das amostras que chegam aos laboratórios de investigação forense. No entanto, nem sempre estas amostras se encontram nas melhores condições de conservação, surgindo muitas vezes amostras com material genético degradado e com baixo número de cópias, designadas de amostras *Low Copy Number*. Nestes casos, a análise genética é ainda mais meticulosa, uma vez que a perda de uma pequena quantidade de DNA pode significar a não determinação de um perfil genético.

O processo que envolve a obtenção de um perfil de DNA a partir de uma qualquer amostra forense decorre desde a colheita até à análise do polimorfismo identificativo do indivíduo ao qual pertence a amostra recolhida.

Toda a análise de amostras forenses requerem um conjunto de normas de colheita que devem ser rigorosamente cumpridas, nomeadamente quando se trata de amostras LCN onde o pouco DNA existente deve ser recuperado e preservado isento de qualquer contaminação externa. Deste modo, a recolha das amostras deve ser feita utilizando meios de protecção individual e o método de recolha do material genético deve ser adequado ao suporte onde o material se encontra. A extracção do DNA requer também um conjunto de precauções e uma metodologia rigorosa para que todo, ou pelo menos, grande parte do DNA presente na amostra recolhida possa ser extraído. Os principais métodos de extracção utilizados em genética forense são o *Chelex* e a extracção orgânica com fenol clorofórmio, apesar de existirem protocolos mais complexos com recurso a *kits* comerciais, designadamente o *DNA IQTM* e o *QiaAmp* que no entanto apresentam algumas reservas no que respeita à quantidade de DNA extraído.

Depois de realizada a extracção, recorre-se à quantificação do DNA extraído, nomeadamente pela técnica de PCR. Esta técnica é uma metodologia rápida e

extremamente útil para analisar o DNA a partir de material humano degradado encontrado em amostras biológicas antigas ou parcialmente deterioradas. Por este motivo, as provas baseadas na PCR converteram-se num método *standard* utilizado na prática laboratorial da polícia científica. No entanto, como complemento ou melhoria desta técnica, têm surgido publicações que apresentam várias formas de amplificação do DNA, nomeadamente o aumento do número de ciclos, o *Nested* PCR, a Amplificação Total do Genoma ou a PCR em Tempo Real que aumentam significativamente a eficiência da PCR tradicional. Uma forte contrariedade da utilização desta técnica é a presença de inibidores entre os quais os constituintes do solo, a hemoglobina presente em amostras de sangue ou os próprios compostos dos métodos de extracção que incapacitam a DNA polimerase de actuar, inibindo a Reacção em Cadeia da Polimerase.

Os actuais métodos de análise de DNA envolvem a análise de polimorfismos, nomeadamente a análise de STRs, SNPs e mtDNA. A análise dos STRs pode ocorrer nos autossomas ou nos cromossomas sexuais (Y-STRs e X-STRs) sendo preferível a qualquer outro marcador uma vez que tem um maior poder discriminatório. Para análise destes polimorfismos recorre-se a *kits* comerciais, como o *PowerPlex16* ou *AmpℓSTR Identifiler*, ensaios *multiplex* que possibilitam a análise de vários STRs em simultâneo. Mais recentemente, o recurso à análise de miniSTRs tornou-se um método imprescindível quando se analisam amostras com alto grau de degradação ou com uma quantidade reduzida de DNA, nomeadamente ossos e dentes antigos, fios de cabelo, manchas de sangue ou impressões digitais. Esta técnica utiliza um conjunto de ensaios *miniplex*, que tal como os STRs, amplificam vários *loci* em simultâneo. Mais recentemente, também para a análise destes marcadores, se recorre à utilização de *kits* comerciais como o *AmpFℓSTR® MiniFiler™*.

O recurso à análise de mtDNA actualmente só acontece quando não existe qualquer possibilidade de extracção de DNA nuclear, uma vez que apresenta um poder discriminatório muito menor que os STRs.

Os SNPs, característicos por apresentarem apenas variações numa base, são também utilizados na genética forense, no entanto são necessários vários SNPs para se atingir o poder discriminatório dos STRs. Estes polimorfismos podem ser analisados recorrendo a um dos seguintes quatro mecanismos moleculares: hibridação alelo-específica, extensão de

primers, ligação de oligonucleótidos e clivagem invasiva. O *SnopShot* e a pirosequenciação são métodos de referência para análise destes marcadores.

No final da revisão bibliográfica apresentada, pode concluir-se que, de uma forma geral os objectivos inicialmente propostos foram atingidos e que esta investigação científica relata as mais recentes conclusões científicas na análise de polimorfismos em genética forense, nomeadamente na análise de amostras degradadas.

Capítulo 7

Bibliografía

Bibliografia

ALESSANDRINI, F., Cacati, M., Pesaresi, M., Turchi, C., Carle, F., Tagliabracci, A. (2003). Fingerprints evidence for a genetic profile: morphological study on fingerprints and analysis of exogenous and individual factors affecting DNA typing. *Journal of Forensic Sciences*. Volume 48. 586 - 592.

ANDRADE, L., Bento, A. M., Serra, A., Carvalho, M., Gamero, J. J., Oliveira, C., Batista, L., Lopes, V., Balsa, F., Corte-Real, F., Anjos, M. J. (2008). AmpFISTR1 MiniFilerTM PCR amplification kit: The new miniSTR multiplex kit. *Forensic Science International: Genetics Supplement*. Série 1. 89 – 91.

ANDREW P. (1999). Human Molecular Genetics 2. *Garland Science: Strachan Tom and Read*. New York and London.

ASAMURA, H., Sakai, H., Ota, M., Fukushima, H. (2007). MiniY-STR quadruplex systems with short amplicon lengths for analysis of degraded DNA samples. *Forensic Science International: Genetics*. Volume 1. 56 – 61.

ASARI, M., Umetsu, K., Adachi, N., Azumi, J., Shimizu, K., Shiono H. (2007). Utility of haplogroup determination for forensic mtDNA analysis in the Japanese population. *Legal Medicine*. Volume 9. 237 – 240.

BALOGH, M. K., Burger, J., Bender, K., Schneider, P. M., Alt, K. W. (2003). STR genotyping and mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper. *Forensic Science International*. Volume 137. 188 - 195.

BALLANTYNE, K. N., Van Oorschot, R. A. H., Mitchell, R. J. (2007). Comparison of two whole genome amplification methods for STR genotyping of LCN and degraded DNA samples. *Forensic Science International*. Volume 166. 35 - 41.

BARBARO, A., Falcone, G., Barbaro, A. (2000). DNA typing from hair shaft. *Prog. Forensic Genet.* Volume 8. 523 – 525.

BENDER, K., Nehlich, C., Harrison, C., Musgrave-Brown, E., Syndercombe-Court, D., Schneider, P. M. (2006). A multiplex SNP typing approach for the DNA pyrosequencing technology. *International Congress.* Série 1288. 73 – 75.

BÉRAUD-COLOMB, Roubin, R., Martin J., Maroc, N., Gardeisen, A. (1995). Human b-globin gene polymorphism characterized in DNA extracted from ancient bones 12.000 years old. *Journal Human Genetic.* 1267 - 1274.

BONACCORSO, N. (2004). Análise Forense de DNA. *Dissertação de Mestrado em Medicina Forense.* Faculdade de Direito da Universidade de São Paulo. São Paulo.

BROWN, T.A. (2002). Genomes. *Garland Science.* New York and London.

BUDOWLE, B., Hobson, D., Smirick, J., Smith, J. (2001). Proceeding of the Twelfth International Symposium on Human Identification. Madison. Wisconsin: *Promega Corporation.*

BUGER, J., Hummer, S., Herrmann, B., Henke, W. (1999). DNA preservation: a microsatellite – DNA study on ancient skeletal remains. *Electroforesis.* Volume 20. 1722 - 1728.

BUTLER, J. M. (2003). MiniSTRs: Past, Present, and Future. National Institute of Standards and Technology. Disponível em www.appliedbiosystem.com, 02-11-2008.

BUTLER, J., Shen, Y., McCord, B. (2003). The developmente of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *Jornal of Forensic Sciences.* Volume 48. 1054 - 1064.

BUTLER, J. (2005). Forensic DNA Typing.. *Elservier Academic Press.* Volume 2.

BUTLER, J. M., Hill, C. R., Decker, A. E., Kline, M. C., Vallone, P. M. (2008). New autosomal STR loci. *Forensic Science International: Genetics Supplement*. Série 1. 95 – 96.

CALABREZ, M. C. T. (1999). Influência do calor na análise de DNA extraído de sangue e tecidos humanos: importância para a identificação de corpos carbonizados. *Dissertação de Doutorado*. Universidade de São Paulo. São Paulo.

CAPELLI, C. Tschentscher, F., Pascali, V. (2003). “Ancient” protocols for the crime scene? Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis. *Forensic Sciences International*. Volume 131. 54 - 64.

CARRACEDO, A., Sánchez-Diz, P. (2005). Forensic DNA-Typing Technologies. In: Forensic DNA Typing Protocols. *Human Press*. Towa, New Jersey. 1 – 11.

CARRACEDO, A., Laréu, M. (1998). Proceedings from the Ninth International Symposium on Human Identification. *Madisson*. Wisconsin: Promega corporation. 89 - 107.

CARVALHO, T., Martins, R. (2008). CONCEITOS BÁSICOS DE GENÉTICA COM APLICAÇÃO À INVESTIGAÇÃO CRIMINAL, in: CSI Criminal (Pinheiro M. F. T.). *Edições Universidade Fernando Pessoa*, Porto, ISBN: 9789896430030. 83 - 94.

CASTELLA, V., Dima-Simonin, N., Brandt-Casadevall, C., Robinson, N., Saugy, M., Taroni, F., Mangin, P. (2006). Forensic identification of urine samples: a comparison between nuclear and mitochondrial DNA markers. *International Journal Legal Medicine*. Volume 120. 67 - 72.

COBLE, M., Butler, J. (2005). Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA. *Journal of Forensic Sciences*. Volume 50. 43 - 53.

COBLE, M., Hill, B., Vallone, P., Butler, J. (2006). Development, characterization and performance of new miniSTR *loci* for typing degraded samples. *Progress in Forensic Genetics 11*. The Netherlands. *International Congress Series*. Elsevier Science. Amsterdam. Volume 1288. 504 - 506.

COBLE, M. (2006a). Introduction to Mitochondrial DNA Analysis. National Forensic Science Technology Center Mitochondrial DNA Workshop (Largo, FL) - mtDNA introduction. Disponível em <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/NISTpub.htm>, 2008-11-26.

COBLE, M. D., Vallone, P. M., Just, R. S., Diegoli, T. M., Smith, B. C., Parsons T. J. (2006b). Effective strategies for forensic analysis in the mitochondrial DNA coding region. *International Journal Legal Medicine*. Volume 120. 27 – 32.

COOPER, G. M. (2001). FUNDAMENTO DE BIOLOGIA MOLÉCULAR. *In*: A célula: uma abordagem molecular. *ArtMed EDITORA*. Brasil. ISBN: 0878931066. 114 - 158.

ELLIOTT, K., Hill, S. D., Lambert, C., Burroughes, T. R., Gill, P. (2003). Use of laser microdissection greatly improves the recovery of DNA from sperm on microscope slides. *Forensic Science International*. Volume 137. 28–36.

FINDLEY, I., Taylor, A., Quirke, P., Frazier, R., Urquhart, A. (1997). DNA fingerprinting from single cells. *Nature*. Volume 389. 555 – 556.

GILL, P., Sparker, R., Pinchin, R., Clayton, T., Whitaker, J., Buckleton, J. (1998). Interpreting simple STR mixtures using *allele* peak area. *Forensic Sciences International*. Volume 91. 41 - 53.

GILL, P., Whitaker, J., Flaxman, C., Brown, N., Buckleton, J. (2000). Na investigation of the rigor interpretation rules for STR derives from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sciences International*. Volume 120. 17 - 40.

GILL, P., Sparkes, R., Tully, G. (2001). DNA profiling in forensic science. Encyclopedia of Life Sciences. *John Wiley & Sons*. 1 - 8.

GILL, P. (2001). Application of Low Copy Number DNA Profiling. *Croatian Medical Journal*. Volume 43. 229 – 232.

GILL, P., Fereday, L., Morling, N., Schneider, M. P. (2006). The evolution of DNA databases - Recommendations for new European STR loci. *Forensic Sciences International*. Volume 156. 242 – 244.

GILL, P., Brenner, C. H., Buckleton, J. S., Carracedo, A., Krawczak, M., Mayr, W. R., Morling, N., Prinz, M., Schneider, P. M., Weir, B. S. (2006). DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Science International*. Volume 160. 90 – 101.

GRIBBEN, J. G., Freedman, A.S., Woo, S. D. (1991). All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. *Blood*. Volume 78. 275.

GRIFFITHS, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M. (2000). An introduction to genetic analysis. W. H. Freeman. New York. Volume 7. 365 - 462.

GRILO, L. T. (2001). O DNA. In: Engenharia Genética: Princípios e aplicações (Videira, P. A.). *Lidel*. Lisboa. ISBN: 9727571638. 3 - 14.

GRUBWIESER, P., Mühlmann, R., Berger, B., Niederstätter, H., Pavlic, M., Parson, W. (2006). A new “miniSTR-multicomplex” displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA. *International Journal of Legal Medicine*. Volume 120. 115 - 120.

GUSMÃO, L., Alves C., Sa´nchez-Diz, P., Zarrabeitia, M. T., Abovich, M. A., Aragón, I., Arce, B., Arrieta, G., Arroyo, E., Atmetlla, I., et al. (2008). Results of the GEP-ISFG collaborative study on an X-STR Decaplex: Research article. *Forensic Science International: Genetics Supplement*. Série 1. 677 - 679.

HÄNNI, C., Brousseau, T., Laudet, V., Stehelin, D. (1995). *Nucleic Acids Res.* Volume 23, 881 - 882.

HANSON, E., Ballantyne, J., (2005). Whole genome amplification strategy for forensic genetic analysis using single or few cell equivalents of genomic DNA. *Analisis Biochimistry*. Volume 346. 246 – 257.

HUDLOW, W. R., Chong, M. D., Swango, K. L., Timken, M. D., Buoncristiani, M. R. (2008). A quadruplex real-time qPCR assay for the simultaneous assessment of total human DNA, human male DNA, DNA degradation and the presence of PCR inhibitors in forensic samples: A diagnostic tool for STR typing. *Forensic Science International: Genetics*. Volume 2. 108 - 125

JEFFREYS, A. J., BROOKFIELD, J. F. Y., SEMEONOFF, R. (1985). Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*. Volume 317. 818 - 819.

JOBIM, L. F., Jobim, M. R., Ewald, G., Wilson, M. J., Chamum, B. (2008). Novos Testes de DNA na Investigação de Paternidade com Suposto Pai Falecido. Disponível em <http://www.dnareference.com.br/>, 2008-11-26.

JOBLING, M. A., Gill, P. (2004). “Encoded Evidence: DNA In Forensic Analysis”. in: *Nature Reviews: Genetics*. Volume 5. 139 - 171.

JEFFREYS, A. J.; BROOKFIELD, J. F. Y; SEMEONOFF, R. (1985). Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*. Volume 317, 818 - 819.

KIRBY, L. T. (1992). DNA fingerprinting: an introduction. W.H.Freeman & Co. New York.

KLOOSTERMAN, A. D. e Kersbergen, P. (2003). Efficacy and limits of genotyping low copy number DNA samples by multiplex PCR of STR loci. *International Congress Séries*. Volume 1239. 795 – 798.

LAGOA, A. (2007). Análise genética de impressões digitais: amostras *Low Copy Number*. *Dissertação de Mestrado em Ciências Forenses*. Faculdade de Medicina. Universidade do Porto. Porto.

LAGOA, A., Pinheiro, M. F. T. (2008). AMOSTRAS LOW COPY NUMBER, in: CSI Criminal (Pinheiro M. F. T.), *edições Universidade Fernando Pessoa*. Porto. ISBN: 9789896430030, 59 – 81.

LECLAIR, B., Sgueglia, J., Wojtowicz, P., Juston, A., Fregeau, C., Fournay, R. (2003). STR DNA typing: increased sensitivity and efficient sample consumption using reduced PCR reaction volume. *Journal of Forensic Sciences*. Volume 48. 1001 - 1013.

LEEMANS, P., Vandeput, A., Vanderheyden, N, Cassiman, J., Decorte, R. (2006). Evaluation of the methodology for the isolation and analysis of LCN-DNA before and after dactyloscopic enhancement of fingerprints. *International Congress Series*. Volume 1288. 583 - 585.

MARJANOVIC, D., Pasic-Durmic, A., Bakal, N., Haveric, S., Kalamujic, B, Kovacenic, L., Ramic, J., Pojskic, N., Skaro, V., Projic, P., Bajrovic, K, Haddziselimovic, R., Drobic, K., Huffine, E., Davoren, J., Primorac, D., (2007). DNA Identification of Skeletal Remains from World War II Mass Graves Uncovered in Slovenia. *Forensic Science*. Volume 48. 513 - 519.

MCPHERSON, M. J., Quirke, P., Taylor, G. R. (1991). *PCR: A Practical Approach. The practical Approach series.*

MOURA-NETO, R. S. (1998). A Investigação de Crimes Sexuais através do Estudo do DNA. In: *Panorama da Justiça*. Volume 10.

NARKUTI, V., Vellanki R. N., Gandhi, K. P. C. Doddapaneni, K. K. Yelavarthi, P. D., Mangamoori, L. N. (2007). Microsatellite mutation in the maternally/paternally transmitted D18S51 locus: Two cases of allele mismatch in the child. *Clinica Chimica Acta*. Volume 381. 171 - 175.

NG, K., Ng A., Cholette, F., Davis, C., (2007) Optimization of recovery of human DNA from envelope flaps using DNA IQTM System for STR genotyping. *Forensic Science International: Genetics*. Volume 1. 283 - 286.

PANG, B., Cheung, B., (2007). Double swab technique for collecting touched evidence. *Legal Medicine*.

PARDO, E. A., Albarrán, M. S. R., Yguacel, P. M., Sánchez, J. D. C. (1999). AISLAMIENTO Y BIOQUÍMICA DEL ADN ANTIGUO, in: La Prueba del ADN en Medicina Forense – La Genética el Servicio de la Ley en el análisis de indicios criminales y en la investigación biológica de la paternidad (Jarreta, M. B. M.). *Masson*, Barcelona. ISBN: 8445808168. 153 - 165.

PARSONS, T. J., Huel, R., Davoren, J., Katzmarzyk, C., Milos, A., Selmanovic, A., Smajlovic, L., Coble, M. D., Rizvic A. (2007). Application of novel “mini-amplicon” STR multiplexes to high volume casework on degraded skeletal remains. *Forensic Science International: Genetics*. Volume 1. 175 - 179.

PINHEIRO, M. F. T. (2008). A PERÍCIA EM GENÉTICA E BIOLOGIA FORENSE – CRIMINALÍSTICA BIOLÓGICA, in: CSI Criminal (Pinheiro M. F. T.), *Edições Universidade Fernando Pessoa*, Porto, ISBN: 9789896430030, 11 - 40.

QUINTÁNS, V., Ivarez-Iglesias, A., Salas, A., Phillips. C., Lareu, M. V., Carracedo A. (2004). Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. *Forensic Science International*. Volume 140. 251 - 257.

ROMANO, C., Di Luise, E., Di Martino, D., Spitaleri, S., Saravo, L. (2006) A novel approach for genotyping of LCN-DNA recovered from highly degraded samples. *International Congress Séries*. Volume 1288. 577 - 579.

SANCHEZ, J. J., Endicott, P. (2006). Developing multiplexed SNP assays with special reference to degraded DNA templates. *Nat Protoc*. Volume 1. 1370 -1378.

SCHULLER, W., Fereday, L., Scheithauer, R. (2001). Manual de Interpol sobre el Intercambio y la utilizacion de datos relativos al ADN: Recomendaciones de Grupo de Expertos em ADN de Interpol.

SCHMERER, W., Hummel, S., Hermann, B. (1999). Optimized DNA extration to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target. *Electroforesis*. Volume 20.

SCHNEIDER, P., Balogh, K., Naveran, N., Bogus, M., Bender, K., Laréu, M., Carracedo, A., (2004). Whole genome amplification – the solution for a common problem in forensic casework? *International Congress Series*. Volume 1261. 24 - 26.

SCHIFFNER, L. A., Bajda E. J., Prinz, M., Sebastyen, J., Shaler, R., Caragine, T. A., (2005). Optimization of a Simple, Automatable Extraction Method to Recover Sufficient DNA from Low Copy Number DNA Samples for Generation of Short Tandem Repeat Profiles. *Forensic Science*. Volume 46. 578 - 586.

SIMÓN, L. F., Gay, M. A., Lozano, F. C., Acosta, J. A. L., Ruiz-Canela, M. V. P., Martín, E. R. (2000). Recomendaciones para la recogida y envío de muestras con fines de Identificación Genética. *Grupo Español y Portugues de la ISEFG*. Madeira.

SOBRINO, B., Carracedo, A. (2005). SNP typing in Forensic Genetics - Forensic DNA Typing Protocols. *Humana Press*. New Jersey. 107 - 126.

SOBRINO, B., Brión, M., Carracedo, A. (2005a). SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International*. Volume 154. 181 - 194.

STROM, C., Rehitky, S. (1998). Use of Nested PCR to identify charred human remains and minute amounts of blood. *Journal of Forensic Sciences*. Volume 43. 696 - 700.

SWANGO, K. L., Timken, M. D., Chong, M. D., Buoncristiani, M. R. (2006). A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. *Forensic Science International*. Volume 158. 14 - 26.

SZIBOR, R., Plate, I., Heinrich, M., Michael, M., Schöning, R., Wittig, H., Lutz-Bonengel, S. (2007). Mitochondrial D-loop (CA)_n repeat length heteroplasmy: frequency in a German population sample and inheritance studies in two pedigrees. *International Journal Legal Medicine*. Volume 121. 207 - 213.

TABERLET, P., Griffins, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L., Bouvet, J. (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*. Volume 24. 3189 - 3194.

TURRINA, S., Atzei, R., Filippini, G., Leo, L. De (2008). STR typing of Archival Bouin's fluid-fixed paraffin-embedded tissue using new sensitive redesigned primers for three STR loci (CSF1P0, D8S1179 and D13S317). *Journal of Forensic and Legal Medicine*. Volume 15. 27 - 31.

TAUTZ, D. (1993). *Notes on definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences*, in: DNA fingerprints (Pena, D. J., Chakraborty, R., Epplen, J. T., Jeffreys, A. J.). *State Science*. Birkhauser Verlag: Basel. 21 - 28.

VAN HOOFFSTAT, D. E., Deforce, D. L., De Pauw, I., Janssen, K., Mestdagh, M. (1998). DNA typing of fingerprints and skin debris: sensitivity of capillary electrophoresis in forensic applications using multiplex PCR, in: *Proceedings of the 2nd European Symposium of Human Identification*. 131 - 137.

VAN HOOSFSTAT, D., Deforce, D., De Pauw, I., Jassen, K., Mestdagh, M. (1998). DNA typing of fingerprints and skin debris: sensitivity of capillary electrophoresis in forensic applications using multiplex PCR. *Proceeding of 2nd European Symposium of Human Identification*. 131 - 137.

VAN OORSCHOT, R., Phelan, D., Furlong, S., Scarfo, G., Holding, N., Cummins, M. (2003). Are you collecting all the available DNA from touched objects?. *International Congress Series*. Volume 1239. 803 - 807.

VEGA, F. M., Lazaruk, K. D., Rhodes, M. D., Wenz, M. H. (2005). Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: *TaqMan® SNP Genotyping Assays* and the *SNPlex™ Genotyping System*. *Mutation Research*. Volume 573. 111 - 135.

VIDEIRA, P. A., (2001). Engenharia Genética: Princípios e aplicações. Lidel. Lisboa. ISBN: 9727571638. 3 - 14.

WALSH, P., Erlich, H., Higuchi, R. (1992). Preferencial PCR amplification of *alleles*: Mechanisms and solutions. *PCR Methods Applications*. Volume 1. 241 - 250.

WEEDN, V. W., Swarnen, S. L. (1998). *Exames forenses de identificação por análises do DNA*, in: Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais (Henry, J. B.). Volume 19. Manole. São Paulo. Capítulo 63. 1427 - 1438.

WIEGAND, P., Trubner, K., Kleiber, M. (2000). STR typing of biological stains on strangulation tools. *Progress in Forensic Genetics*. Volume 8. 508 - 513.

WHITAKER, J., Cotton, E., Gill, P. (2001). A comparason of the characteristics of profiles produced with the AmpF1STR®SGM Plus™ multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis. *Forensic Science International*. Volume 123. 215 – 223.